

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Detekce poškození DNA a sledování jeho opravy
(diplomová práce)

Detection of the DNA damage and its repair
(thesis)

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.
Konzultant: prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.

V Hradci Králové dne

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Rudolfu Štětinovi, CSc. a PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D. za věcné připomínky při zpracování diplomové práce a Mgr. Haně Rajhelové za spolupráci při experimentální části práce.

Zvláštní dík patří Mgr. Petru Joštovi za precizní kontrolu textu, věcné připomínky k němu a za asistenci při experimentech. Děkuji také Michalu Mauserovi za „znovuoživení“ počítače.

OBSAH

ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	6
1. TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1. MUTAGENY	7
Fyzikální mutageny	7
Chemické mutageny.....	8
Biologické mutageny.....	9
1.2. OPRAVA POŠKOZENÉ DNA.....	10
Bázová excisní reparace	10
Nukleotidová excisní reparace	10
Oprava chybného párování bází (mismatch repair).....	11
Oprava poškození způsobeného UV zářením	11
Oprava alkylací v DNA.....	11
Oprava jednořetězcových zlomů.....	12
Oprava dvouřetězcových zlomů	12
1.3. ANTINEOPLASTIKA	13
látky inhibující biosyntézu nukleových kyselin	13
látky poškozující strukturu a funkci nukleových kyselin.....	13
látky inhibující mitózu	14
látky s kombinovaným či se zcela neobjasněným mechanismem účinku	14
léčiva pro cílenou protinádorovou terapii	14
hormonální léčiva	14
imunomodulační léčiva.....	14
Cis-platina	15
2. CÍL - ZADÁNÍ PRÁCE	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1. POMŮCKY A PŘÍSTROJE	24
3.2. CHEMIKÁLIE.....	25
3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	26
3.4. METODY	28
Kometový test (Comet assay).....	28
MTT test (MTT assay).....	29
3.5. PRACOVNÍ POSTUP.....	30
3.6. ZKOUMANÉ BUNĚČNÉ LINIE:	34
4. VÝSLEDKY.....	35
4.1. STANOVENÍ OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE SO PRO DETEKCI KŘÍŽOVÝCH VAZEB	35
4.2. SLEDOVÁNÍ INDUKCE A REPARACE KŘÍŽOVÝCH VAZEB V DNA RŮZNÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ	
36	
4.3. POROVNÁNÍ VIABILITY RŮZNÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ PO PŮSOBNÍ CIS-PT.....	48
5. DISKUSE	49
5.1. POŠKOZENÍ DNA ZLOMY	49
5.2. POŠKOZENÍ DNA KŘÍŽOVÝMI VAZBAMI A JEJICH REPARACE.....	49
5.3. VIABILITA BUNĚČNÝCH LINIÍ PO OVLIVNĚNÍ CIS-PLATINOU A REPARACI POŠKOZENÍ.....	50
6. ZÁVĚR	53
SEZNAM ZKRATEK.....	54
ZDROJE.....	55

ABSTRAKT

V této diplomové práci jsem se zabývala sledováním indukce a reparace křížových vazeb způsobených *cis*-platinou, k jejichž detekci byl použit modifikovaný kometový test. Experimenty byly prováděny na liniích A-549, HeLa, HELF, XPA, XPC, CHO AA8 a CHO UV-20 (linie XPA, XPC a CHO UV-20 jsou deficitní v genech potřebných pro korektní opravu poškozené DNA).

Poškození bylo indukováno jednu hodinu 20, 40, 80 a 160 μ M *cis*-Pt, reparace probíhala po dobu 3 a 23 hodin. K detekci křížových vazeb byly buňky inkubovány v přítomnosti 800 μ M styrenoxidu (SO), poté byla provedena alkalická verze kometového testu a analýza vzorků pomocí softwaru LUCIA® Comet Assay.

Nejnižší indukce křížových vazeb po jedné hodině byla zaznamenána u buněčné linie A-549 a XPC (87 a 86 % DNA v ohonu), nejvyšší u CHO UV-20 (70 % DNA v ohonu). Po čtyřech hodinách inkubace byl u všech buněčných linií pozorován nárůst poškození DNA křížovými vazbami (největší u linií HELF a XPA, % DNA v ohonu se snížilo o 49 a 48 %). Oprava poškozené DNA po 24 hodinách byla pozorována u buněčných linií A-549 (reparace 44, 68 % poškození) a CHO AA8 (odstraněno 33,12 % poškození). U ostatních linií byl pozorován další nárůst množství křížových vazeb.

Na závěr byl proveden MTT test sledující viabilitu buněk ovlivněných *cis*-Pt. Největší citlivost k cytotoxickým účinkům *cis*-Pt projevila buněčná linie CHO UV-20 (pokles viability o 43,90 %), nejnižší linie HeLa a CHO AA8 (pokles o 1,82 % u HeLa buněk; 9,86 % u CHO AA8). Citlivost ostatních linií leží mezi těmito mezními hodnotami (pokles viability o 17,97-24,14 %).

ABSTRACT

The subject of this thesis is the observation of induction and reparation of DNA cross-links induced by *cis*-platin (*cis*-Pt). The modified Comet Assay was used to detection. The experiments were carried out on cell lines A-549, HeLa, HELF, XPA, XPC, CHO AA8 and CHO UV-20 (there are mutations in genes needed for keeping DNA unimpaired in cell lines XPA, XPC and CHO-UV 20).

The damage was induced by presence of 20, 40, 80 and 160 μ M *cis*-Pt for one hour. The cells were divided into three groups for reparation observations at one, three and twenty three hour marks. Then the cells were incubated with styrene oxide (SO) for 30 minutes to enable the detection of cross-links. Alkaline Comet Assay was carried out afterwards, software LUCIA® Comet Assay was used to analyse the samples.

The cell lines A-549 and XPC showed the lowest induction of cross-links after one hour (87 and 86 % tail DNA), CHO-UV 20 showed the highest induction (70 % tail DNA). The number of cross-links rose after four hours in all types of used cell lines (the highest increase was observed in lines HELF and XPA, % tail DNA was reduced by 49 and 48 %). The reparation of DNA after 24 hours was registered in cell lines A-549 and CHO AA8 (44,68 % of cross-links was repaired in A-549 and 33,12 % in CHO AA8). The remaining cell lines showed an increased number of cross-links but no reparation.

As the last experiment, an MTT test was carried out to compare viability of the *cis*-Pt treated cells with the control group. The most sensitive cell line to the cytotoxic action of *cis*-Pt is cell line CHO UV-20 (decline of viability by 43,90 %), and the lowest level of sensitivity was in lines HeLa and CHO AA8 (decline of viability HeLa cells by 1,82 %; CHO AA8 by 9,86 %). Sensitivity of the other examined cell lines lies between these marginal values.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Mutageny

Pojmem mutagen se rozumí fyzikální, chemický nebo biologický faktor, který je schopen vyvolat genetickou mutaci, či zvýšit pravděpodobnost jejího vzniku, tedy způsobit změnu v primární struktuře DNA chromozomu. Tvorba mutací se nazývá mutageneze.

1.1.1. Fyzikální mutageny

Ionizující záření – gama, kosmické a Roentgenovo záření (X-záření)

Toto záření má na DNA efekt přímý i nepřímý. Přímé poškození vzniká interakcí záření s DNA, nepřímé interakcí DNA a reaktivních částic vytvořených zářením.

Hlavním zdrojem nepřímého poškození jsou produkty radiolýzy vody, tedy H_2O^+ a e^- (v menší míře i produkty excitace molekuly vody a její následné homolýzy na H^\bullet a $^\bullet\text{OH}$).¹ V následujících reakcích se vytvářejí další reaktivní částice - volné radikály (molekuly s nepárovým elektronem), např. $^\bullet\text{OH}$, H^\bullet , O_2^\bullet ; H_2 , H_2O_2 , a také solvatované elektrony. Většina poškození - odhaduje se, že zhruba 65 % - je pravděpodobně způsobena nepřímo radikály (hlavně hydroxylovými), zbylých 35 % přímou ionizací DNA.

Reakcemi bází se vzniklými radikály dochází k jejich hydroxylaci, deaminaci, fragmentaci kruhu báze či další cyklizaci nebo vazbě sousedních i protilehlých bází DNA. Mohou vznikat také křížové vazby mezi poškozenými bázemi a proteiny (např. mezi thymidinem a tyrosinem). Radikály je poškozena též cukerná složka nukleotidů (hydroxylace, otevření kruhu). Ionizující záření také dosti často indukuje lokální denaturaci řetězců.

Reakce hydroxylových radikálů s cukernou složkou DNA vede ke zlomům řetězců DNA, v nichž mnohonásobně převažují zlomy jednořetězcové nad dvouřetězcovými. Poškození DNA, jako saturace kruhu bází, vede k destabilizaci N-glykosidické vazby a vzniku apurinových a apyrimidinových deoxyribosových reziduí (alkalilabilních míst, která mohou být snadno převedena na zlomy). Zlomy řetězců DNA způsobuje ionizační záření také přímo, a to jak jedno-, tak dvouřetězcové. Dochází k tomu ionizací a excitací elektronů přítomných v atomech makromolekuly, čímž je dodána energie ke štěpení vazeb a tím ke zlomům řetězců.

Ultrafialové záření

Ultrafialové (UV) záření se podle vlnové délky dělí na tři skupiny: UV-A (400 až 320 nm), UV-B (320 až 295 nm) a UV-C (295 až 100 nm). Většina záření UV-C a převážná část UV-B je pohlcena ozónovou vrstvou atmosféry, která s různou intenzitou zadržuje vlnové délky pod 300 nm, vlnové délky pod 295 nm atmosférou prakticky nepronikají. Na poškození genetické informace se tak podílí hlavně UV-A (tvoří zhruba 99 % propuštěného UV záření), UV-B záření se na poškození DNA účastní mnohem menší měrou.

Při vystavení DNA vlnovým délkám, které se blíží jejímu absorpčnímu maximu (kolem 260 nm), se saturací 5,6 dvojných vazeb vytváří kovalentní vazby mezi sousedními pyrimidiny. Touto reverzibilní fotochemickou cykloadicí tak vznikají cyklobutanové

pyrimidinové dimery (C-C, C-T, T-T), které jsou mimořádně odolné vůči extrémním hodnotám pH a teploty. Předpokládá se ale, že na poškození DNA má větší vliv tvorba 6-4 T-C, C-C a T-T dimerů, rovněž vyvolaná UV zářením. Tyto adukty jsou na rozdíl od výše uvedených alkalilabilní. Dimerizaci po UV záření podléhají i puriny.

Další typy fotoreakcí způsobují hydroxylaci a následnou deaminaci pyrimidinů, křížové vazby mezi DNA a proteiny, výjimečně i mezi různými dvoušroubovicemi DNA, a také zlomy řetězců. Uvedené reakce jsou výsledkem přímé absorpce fotonu bázemi DNA, které mohou být UV zářením poškozeny i nepřímo již excitovanými molekulami (fotosensitizéry).²

1.1.2. Chemické mutageny

Chemických látek s mutagenním účinkem existuje nepřeberné množství, namátkou lze jmenovat např. akridinová barviva, složky cigaretového kouře, spalín a výfukových plynů, polychlorované bifenyly, dioxiny...

Tyto látky působí rozličnými mechanismy – některé vyvolávají mutace pouze při replikaci (analogy bází, deriváty akridinu), jiné i u nereplikující se DNA, další způsobují alkylaci, deaminaci nebo hydroxylaci bází.

Analogy bází

Analogy bází neboli falešné nukleotidy vznikají obměnou fyziologické báze. Při replikaci jsou inkorporovány do nově vznikajících řetězců, strukturní obměny umožňují chybné párování bází, čímž v následující replikaci dojde k tranzici (záměně nukleotidu, bodové mutaci). Příkladem je 5-bromouracil a 2-aminouracil.

Alkylační činidla

Alkylační činidla jsou elektrofilní sloučeniny s velkou afinitou k nukleofilním centřům makromolekul. Zahrnují celou škálu nejrozmanitějších chemikálií [např. yperity, chlormethin, trichlormethin, nitrosoguanidin, melfalan, chlorambucil, cyklofosamid, *cis*-platinu (*cis*-Pt), karboplatinu, mitomycin C, dakarbazin, prokarbazin, N-methyl-N-nitrosoureu...], z nichž mnohé jsou prokázané či suspektní karcinogeny. Mohou vyvolat všechny známé typy mutací včetně chromozomálních zlomů a přestaveb.

Podle počtu reaktivních skupin se rozlišují alkylační činidla monofunkční s jednou reaktivní skupinou a bifunkční se dvěma. V DNA bylo identifikováno mnoho nukleofilních míst, se kterými tato činidla mohou potenciálně reagovat (adenin: N1, N3, N7, N aminoskupiny; guanin: N1, N3, N7, N aminoskupiny, O ketoskupiny; cytosin: N3, N amino- a O ketoskupiny; thymin: N3, O obou ketoskupin; O fosfodiesterové vazby). Obecně jsou dusíky vázané v kruhu bází nukleofilnější než kyslíky, přičemž N7 guanine a N3 adeninu jsou nejreaktivnější.³

V závislosti na chemické struktuře jsou donorem alkylových skupin nebo vytvářejí jednoduché adukty s DNA či křížové vazby mezi dvěma řetězci (interřetězcové), mezi nukleotidy jednoho řetězce (intrařetězcové) nebo mezi DNA a proteiny. Křížové vazby, zvláště interřetězcové, blokují separaci řetězců DNA a tím jejich replikaci a transkripci, čehož se využívá v protinádorové terapii.

Interkalační činidla

Všem interkalačním činidlům je společná planární struktura umožňující vmezeření molekuly činidla do dvoušroubovice DNA. Zde se váže vodíkovými vazbami či po fotoaktivaci UVA zářením tvoří kovalentní vazby s pyrimidiny (hlavně adicí na 5, 6 dvojnou vazbu thyminu). Tímto mechanismem vytváří monofunkční či bifunkční adukty s DNA např. psoraleny.⁴ Mezi interkalační činidla dále patří furanokumariny, antracyklinová antibiotika, deriváty antrachinonu a akridinu a další látky.

Strukturální změna DNA vyvolaná vmezeřením látky vede k deformaci helixu, ohýbání a rozvíjení dvoušroubovice, což spolu s interkalací inhibuje replikaci a transkripci. Indukuje také posun čtecího rámce při replikaci – to má za následek delece a inserce jedné nebo více bází.

Deaminační činidla

Oxidativní deaminace adeninu, guaninu a cytosinu (tedy záměna aminoskupiny za ketoskupinu), způsobená např. kyselinou dusitou, dusitany nebo oxidy dusíku, mění schopnost báze vytvářet vodíkové můstky. V následující replikaci změna bází vyvolává tranzice v obou směrech (C-G na A-T, A-T na C-G).

Hydroxylační činidla

Vazbou hydroxyskupiny na cytosin vzniká hydroxylaminocytosin párující se s adeninem, výsledkem je jednosměrná tranzice C-G na A-T.

Metabolická aktivace nepolárních látek

Mnoho relativně nepolárních (a tím pádem nereaktivních) látek prodělává v organismu metabolickou aktivaci, aby mohly být z organismu snadněji vyloučeny. Takto vzniklý metabolit ovšem již interaguje s nukleofilními centry buňky. Některé z těchto aktivovaných látek jsou silné mutageny a karcinogeny.

Mezi takovéto látky patří např. aromatické aminy (N-2-acetyl-2-aminofluoren), polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[*a*]pyren), N-nitrosoaminy, 4-nitrochinolin-1-oxid, aflatoxiny, elektrofilní metabolity estrogenů a mnohé další.

Metabolické aktivace se účastní enzymy cytochromu P-450, mikrozomální a cytoplasmatické glutathion-S-transferasy, sulfotransferasy, acyltransferasy, UDP-glukuronyltransferasy, adenosylační, methylační a další enzymy.^{5, 6}

1.1.3. Biologické mutageny

Viry

Virová DNA může být během lyzogenního cyklu viru inkorporována do genomu hostitele, čímž je ovlivněna funkce původních genů. Gen s inkorporovanou virovou genetickou informací bývá většinou nefunkční, mohou vznikat chromozomální zlomy či nádorové bujení.

Transpozony

Transpozony jsou elementy se schopností přemisťovat se v genomu z jednoho místa na druhé, tyto jejich přesuny mohou mít mutagenní účinek. V lidském genomu se vyskytují dvě skupiny transponibilních elementů: LINE = long interspred nuclear element a SINE = short interspred nuclear element.⁷

1.2. Oprava poškozené DNA

K tomu, aby genetická informace zůstala zachována v nezměněné podobě, má buňka k dispozici několik mechanismů zajišťujících opravu jak jaderné, tak mitochondriální DNA. K nejdůležitějším patří bázeová excisní reparace, nukleotidová excisní reparace, oprava chybného párování bází (mismatch repair), oprava poškození způsobeného UV zářením, oprava alkylovaných bází a oprava zlomů.

1.2.1. Bázeová excisní reparace

Bázeová excisní reparace (BER) je pravděpodobně nejvíce využívaným mechanismem opravy DNA. Excise je zahájena skupinou jedenácti typů DNA-glykosylas⁸, které katalyzují hydrolýzu N-glykosidické vazby chemicky změněné nebo chybné báze, kterou je ona báze připojena k fosfodiesterové kostře DNA. DNA-glykosylasy podle svého typu rozeznávají pouze určitý druh poškození – jistou chybnou bázi nebo určité chybné párování. Jejich základní funkcí je katalytické uvolnění báze z DNA. Některé jsou monofunkční (pouze uvolňují bázi), jiné bifunkční (kromě glykosylasové aktivity mají i lyasovou aktivitu, kterou štěpí fosfodiesterovou vazbu na 3'-konci vzniklého abázeového místa).

Aktivitou DNA-glykosylas se vytvoří úsek bez báze – apurinové/apyrimidinové (AP) místo specificky rozeznávané AP-endonukleasami. Tyto enzymy hydrolyzují fosfodiesterovou vazbu na 5' konci AP místa, kde vzniká 5'-deoxyribosofosfátový zbytek, který je odstraněn další skupinou enzymů - exonukleasami, nebo DNA-deoxyribosofosfodiesterasami (dRpasami). Vzniklá jednonukleotidová mezera je DNA-polymerasou opravena, DNA-ligasa BER dokončuje. Popsaný průběh není jediný možný, BER může probíhat několika alternativními cestami.⁵

1.2.2. Nukleotidová excisní reparace

Na rozdíl od BER jsou při nukleotidové excisní reparaci (NER) poškozené báze odstraňovány jako nukleotidy, které jsou součástí vyštěpovaného oligonukleotidového fragmentu. NER opravuje především poškození, které má za následek deformaci ve struktuře DNA (to způsobuje např. UV záření, adukty vytvořené polycyklickými karcinogeny, *cis*-Pt, psoraleny atd.). Stejně jako BER je i NER několikastupňový proces zahrnující účast DNA-polymerasy a DNA-ligasy.

Reparace začíná rozpoznáním změny ve struktuře helixu, která byla vyvolána poškozením. Následuje hydrolýza fosfodiesterové vazby na obou stranách změněné báze specifickými endonukleasami a odstranění oligonukleotidového fragmentu o délce asi 24-32 nukleotidů. Vzniklou mezeru reparativně dosyntetizuje DNA-polymerasa, opravu stejně jako u BER dokončuje DNA-ligasa.

NER se účastní na třicet proteinů. Defekty v genech, které je kódují, způsobují vrozené choroby charakterizované zvýšenou citlivostí k UV záření. Mezi tyto choroby patří např. xeroderma pigmentosum, Cockayneův syndrom, trichothiodystrofie, cerebro-okulofacioskeletální syndrom a další. S defektní reparací DNA poškozené UV zářením souvisí také časný rozvoj rakoviny kůže.⁵ Polymorfismy genů potřebných pro NER jsou zodpovědné za rezistenci na terapii *cis*-Pt a chlorambucilem.^{9, 10}

1.2.3. Oprava chybného párování bází (mismatch repair)

Oprava chybného párování bází (mismatch repair, MMR) se uplatňuje při kontrole přesnosti replikace – snižuje výskyt chybně zařazených bází o dva řády (na jednu chybu na 10^9 zkopírovaných nukleotidů z původní jedné chyby na 10^7 zkopírovaných nukleotidů).¹¹ Má tak nezastupitelnou úlohu v udržování stability genomu, svou roli hraje také ve výsledku genetické rekombinace.

Mechanismus opravy je podobný jako u BER a NER – po rozpoznání chybně zařazeného nukleotidu v dceřiném řetězci je tento nukleotid odstraněn exonukleasou 1 a nahrazen správným, což zajišťuje DNA-polymerasa δ . DNA-ligasa nakonec spojí přerušenu fosfodiesterovou kostru DNA.

Stejně jako u výše uvedených opravných mechanismů i u tohoto je pro jeho správnou funkci třeba několik specifických proteinů. Mutace v genech pro tyto proteiny vede k hereditární predispozici k některým typům rakovin (např. k hereditárnímu non-polyposnímu kolorektálnímu karcinomu). Jedním z faktorů rezistence na *cis*-Pt, doxorubicin, etoposid, merkaptopurin, tioguanin, busulfan, prokarbazin a temozolomid jsou polymorfismy právě v těchto genech.⁹

1.2.4. Oprava poškození způsobeného UV zářením

Nejjednodušším, nejefektivnějším a nejpresnějším obecným biochemickým mechanismem, kterým může být opraveno poškození DNA, je jednokroková reakce zahrnující jediný enzym. Takovéto reakce vedoucí přímo k obnově struktury DNA jsou považovány za bezchybně pracující.

Jedním takovým mechanismem, pravděpodobně jedním z nejdříve vyvinutých, je enzymatická fotoreaktivace. Ta odstraňuje pyrimidinové dimery vzniklé účinkem UV záření. Zúčastněné enzymy, DNA-fotolyasy, obsahují dva nekovalentně vázané chromofory, potřebné pro katalytickou aktivitu. Po navázání enzymu na DNA v místě poškození a absorpci světla o vlnové délce větší než 300 nm je dimer monomerizován. (Tyto enzymy, které katalyzují fotoreaktivaci, zatím nebyly nalezeny v genomu placentárních savců. Homology těchto enzymů se uplatňují v regulaci jejich cirkadiálního rytmu.¹²)

1.2.5. Oprava alkylací v DNA

Tato oprava je dalším příkladem přímé reparace poškozených bází zahrnující jeden enzym. Zatím nejlépe prostudovaná je enzymově katalyzovaná dealkylace O⁶-alkylguaninu, O⁴-alkylthyminu, 1-methyladeninu a 3-methylcytosinu.

Alkylace guaninu a thyminu v savcích buňkách odstraňuje enzym O⁶-methylguaninmethyltransferasa, přičemž methylovou skupinu z guaninu a thyminu ireverzibilně váže na cysteinový zbytek ve svém aktivním místě¹³, proto je pro další reparaci nutná její syntéza de novo. Enzym má afinitu především k O⁶-alkylguaninu, demethylace O⁴-alkylthyminu probíhá o několik řádů pomaleji.¹⁴ (Buňky s nadměrnou expresí této transferasy vykazují rezistenci na prokarbazin, dakarbazin, temozolomid, karmustin, lomustin a nitrosoureu.⁹)

V jednořetězcové DNA opravují 1-methyladenin a 3-methylcytosin proteiny ABH (Alkylated DNA repair protein alkB homolog 1) oxidativní demethylací, α -ketoglutarát při této reakci slouží jako kosubstrát a Fe^{2+} jako kofaktor. Oxidovaná methylovaná skupina je z báze uvolněna jako formaldehyd, α -ketoglutarát se mění na sukcinát, z O_2 potřebného pro reakci vzniká CO_2 .¹⁵

1.2.6. Oprava jednořetězcových zlomů

Pokud poškození např. ionizačním zářením způsobí jednořetězcový zlom, na jehož koncích zůstanou zachovány 3'OH a 5'P konce, je takový zlom přímo spojen DNA-ligasou.¹⁶

Zanechá-li poškození alterované konce zlomu, následuje jejich úprava, doplnění nukleotidové mezery (je-li potřebné) a ligace za pomoci specifických enzymů.

1.2.7. Oprava dvouřetězcových zlomů

K opravě dvouřetězcových zlomů využívá buňka dva hlavní mechanismy: homologní rekombinaci (HR) a nehomologní spojení konců (nonhomologous end joining, NHEJ). Defekty v těchto mechanismech mají za následek hereditární onemocnění, jako je např. Nijmegen breakage syndrom, Wernerův syndrom, Bloomův syndrom, Rothmund-Thomsonův syndrom; rezistenci na dusíkaté yperity (HR) a chlorambucil (NHEJ).¹⁷

Homologní rekombinace

Existují nejméně tři různé mechanismy homologní rekombinace, které mohou být použity v S nebo G2 fázi buněčného cyklu k opravě chromozomálních dvouřetězcových zlomů – konverze genu, jednořetězcový annealing a zlomem indukovaná rekombinace.

Oprava zlomu začíná krátkou 5' → 3' resekci obou řetězců, které jsou znovu nasyn-
tetizovány podle homologního chromozomu nebo sesterské chromatidy. Následuje spojení původních řetězců, při kterém většinou nedochází ke crossing-overu.¹⁸

Nehomologní spojení konců

NHEJ je v savcích buňkách dominujícím typem opravy dvouřetězcových zlomů. Je aktivní během celého buněčného cyklu, ale nejdůležitější je v G0 a G1 fázi. Sestává z rozpoznání poškození, odstranění změněných konců nukleasami, dosyntetizování chybějícího úseku a ligace. Účastní se ho sedm hlavních proteinů. Na poškozené konce se navazuje heterodimer složený z proteinů Ku70 a Ku80, katalytická podjednotka DNA-dependentní proteinkinasy (DNA-PKcs), nukleasa Artemis vyštěpující chybné nukleotidy, XRCC4 a XLF (Cernunnos), DNA-ligasa IV oba řetězce spojuje.⁵

1.3. Antineoplastika

Početnou skupinu antineoplastik, léčiv užívaných k terapii nádorových onemocnění, můžeme podle mechanismu účinku rozdělit do několika skupin:

1. látky inhibující biosyntézu nukleových kyselin
2. látky poškozující strukturu a funkci nukleových kyselin
3. látky inhibující mitózu
4. látky s kombinovaným nebo dosud zcela neobjasněným mechanismem účinku
5. léčiva pro cílenou protinádorovou terapii
6. hormonální léčiva
7. imunomodulační léčiva

Látky první až čtvrté skupiny omezují replikaci nádorových buněk, souhrnně se označují jako protinádorová chemoterapeutika. Mechanismy přeměny normální buňky v nádorovou a další procesy důležité pro vznik nádoru (angiogeneze, blokáda apoptózy, inhibice buněčné diferenciaci atd.) ovlivňují látky pro cílenou terapii. Zbývající dvě skupiny léčiv se uplatňují v komplexní terapii.

1.3.1. látky inhibující biosyntézu nukleových kyselin

Do této skupiny patří antimetabolity (analogy kyseliny listové, purinů a pyrimidinů) a inhibitory ribonukleotidreduktasy.

Analogy kyseliny listové působí přímou blokádu syntézy purinů a thyminu (v terapii se často užívají metotrexát, raltitrexed, pemetrexed).

Purinová analoga inhibují syntézu purinů de novo, při inkorporaci do DNA způsobují její nefunkčnost (při léčbě nachází uplatnění např. merkaptopurin, tioguanin, kladribin, fludarabin, klofarabin, nelarabin).

Pyrimidinová analoga působí podobným mechanismem jako analoga purinů (fluorouracil, kapecitabin, tegafur, cytarabin, gemcitabin).

Inhibitory ribonukleotidreduktasy inhibují tvorbu deoxynukleotidů (v klinické praxi je užíván hydroxykarbamid neboli hydroxyurea).

1.3.2. látky poškozující strukturu a funkci nukleových kyselin

Struktura a/nebo funkce nukleových kyselin může být ovlivněna jejich alkylací, interkalací jiné látky či inhibicí topoisomeras při replikaci DNA.

Alkylační látky kovalentní vazbou na nukleofilní centra buňky poškozují strukturu a funkci nejrůznějších makromolekul (cyklofosamid, ifosamid, chlorambucil, melfalan, temozolomid, dakarbazin, busulfan, cis-platina, carboplatina, oxaliplatina, karmustin, lomustin, fotemustin, mitomycin aj. se často uplatňují v praxi).

Interkalační látky interkalací do DNA inhibují replikaci a transkripci (daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantron a další).

Inhibitory topoisomeras způsobují zlomy DNA (topoisomerasu I inhibují kamptoteciny topotekan a irinotekan; topoisomerasu II podofylotoxiny etoposid a teniposid).

1.3.3. látky inhibující mitózu

Označují se také jako mitotické jedy. Využívá se schopnosti těchto látek interagovat s mikrotubuly dělicího vřeténka, které se vytváří v profázi mitózy.

Vinca alkaloidy blokují polymeraci mikrotubulů (vinkristin, vinblastin, vinorelbin, vindesin). *Taxany* stabilizací mikrotubulů znemožňují správnou funkci dělicího vřeténka (v praxi se uplatňují paklitaxel, docetaxel).

1.3.4. látky s kombinovaným či se zcela neobjasněným mechanismem účinku

Mezi tyto látky patří např. mitotan, asparaginasa, anagrelid, estramustin, nearomatické retinoidy (tretinoin, bexaroten), oxid arzenitý, trabectedin, thalidomid, lenalidomid, bortezomib, porfimer a temoporfin.

1.3.5. léčiva pro cílenou protinádorovou terapii

Mezi tato léčiva patří monoklonální protilátky a inhibitory transdukčních signálů. *Monoklonální protilátky* mohou být namířeny např. na růstové faktory (bevacizumab), na extracelulární doménu membránových receptorů (transtuzumab, cetuximab, panitumumab) či na specifické povrchové antigeny nádorových buněk (rituximab, alemtuzumab). Konečným výsledkem vazby protilátky na cílový antigen je lýze buňky způsobená různými mechanismy.

Inhibitory transdukčních signálů zahrnují dvě skupiny: selektivní inhibitory tyrosin-kinas (imatinib, erlotinib) a multiproteinkinasové inhibitory (dasatinib, nilotinib, lapatinib, sunitinib, sorafenib).

1.3.6. hormonální léčiva

Používají se u hormondependentních nádorů obsahujících sexagenní receptory (některé karcinomy prsu, prostaty, endometria). Využívají se hormony mužské a ženské, antiandrogeny, antiestrogeny, inhibitory aromatas, superaktivní analoga gonadorelinu a glukokortikoidy.

1.3.7. imunomodulační léčiva

Mají vliv na imunostimulaci a imunorestauraci (interferony vykazují také antiproliferační účinky), bývají součástí komplexní protinádorové terapie. Používá se např. interferon α , interferon α_{2A} , interferon α_{2B} , aldesleukin a vaccinum tuberculosis vivum (BCG vakcína).³⁹

1.3.8. Cis-platina

Cis-diammin-dichloroplatnatý komplex $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, jak zní chemický název, či zkráceně *cis*-platina (*cis*-Pt), byl poprvé syntetizován roku 1844 italským chemikem Michele Peyronem (1813 až 1883). K tomuto objevu došlo při přípravě „Magnovy zelené soli“, tetrachloroplatnatanu tetraamminoplatnatého $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4][\text{PtCl}_4]$, popsáno již roku 1828 německým lékařem a chemikem Heinrichem Gustavem Maghem (1802 až 1870). Žlutý produkt, pojmenovaný po svém objeviteli „Peyronův chlorid“, vykazoval naprosto odlišné vlastnosti než má Magnova sůl, s níž je izomerní.

Svou práci Peyrone publikoval roku 1844 v *Annalen der Chemie*, v duplikátu zprávy z roku 1845 popisuje tutéž sloučeninu se stejnou strukturou, ale jinými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, než o kterých informoval o rok dříve.¹⁹ Zhruba o padesát let později díky práci švýcarského chemika Alfreda Wernera (1866 až 1919²⁰) bylo možné Peyronův chlorid označit za *cis*-izomer diammin-dichloroplatnatého komplexu.

Výzkum nových protinádorových léčiv se o *cis*-Pt nezajímal do té doby, než americký mikrobiolog Barnett Rosenberg (1926 až 2009) a jeho spolupracovníci v roce 1965 začali zkoumat vliv elektrického pole na dělení bakterií *Escherichia coli*. Nejenže bylo buněčné dělení potlačeno, ale buňky normálně připomínající tyčky vyrostly do filament třístokrát převyšujících původní délku. Důvodem tohoto výsledku bylo, že k experimentu byly použity platinové elektrody, které elektrochemickou reakcí s ionty obsaženými v médiu poskytly *cis*-Pt. Ta dosud nebyla testována, zda má antibakteriální nebo antitumorové vlastnosti, protože bylo známo, že komplexy přechodných kovů jsou jedovaté.

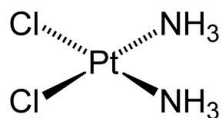
Rosenberg věděl, že jistá cytostatika mají na *Escherichia coli* stejný vliv, jako měla *cis*-Pt (pozastavení dělení a růst do filament), proto s Virginií Mansour zahájil v roce 1968 výzkum antitumorové aktivity *cis*-Pt na myších. V roce 1969 publikovali ohromující výsledek: *cis*-Pt kompletně inhibovala progresi solidního myšího sarkomu-180.²¹ Brzy nato (1971) se rozběhly klinické studie zahrnující i lidské pacienty, které potvrdily protinádorový účinek *cis*-Pt.²² Léčivo bylo americkou FDA (Food and Drug Administration) schváleno v roce 1978.²³

Indikace

Od té doby se *cis*-Pt stala jedním z nejužívanějších cytostatik. Pokud je léčba zahájena včas, je mimořádně účinná proti testikulárním tumorům, účinná vůči melanomům, malobuněčným i nemalobuněčným bronchogenním karcinomům, v kombinační terapii přináší slibné výsledky při léčbě ovariálních nádorů.²¹ Je indikována také při tumorech urogenitální oblasti, hlavy a krku, GIT, sarkomech, karcinomech mozaikového epitelu a maligních lymfomech, ať samostatně nebo v kombinaci s jinými cytostatiky (nejčastěji s vinblastinem, bleomycinem, etoposidem, doxorubicinem, paklitaxelem) a dalšími postupy onkologické léčby.³⁹

Vlastnosti

Molekula *cis*-Pt obsahuje pouze jedenáct atomů, které mají planární uspořádání (viz obr. 1). Její sumární vzorec je $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$, relativní molekulová hmotnost je 300, 045.



Obr. 1 Strukturální vzorec *cis*-platiny^a

V Chemical Abstract Registry (CAS) je jí přiřazeno číslo 15663-27-1. Podle ČL 2009 substance obsahuje 97, 0 % až 102, 0 % sloučeniny $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$.

Je to žlutý prášek nebo žluté či oranžovožluté krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě (k rozpuštění 1 g je třeba 100 až 1000 ml rozpouštědla; při 19 °C se ve 100 ml rozpustí méně než 0,1 g *cis*-Pt²⁴), mírně rozpustná v dimethylformamidu (30 až 100 ml rozpouštědla na 1 g), prakticky nerozpustná v 96% ethanolu (více než 10 000 ml rozpouštědla na 1 g).²⁵

Ve vodném roztoku snadno hydrolyzuje (zejm. při alkalickém pH) a izomerizuje na neúčinný *trans*-izomer.²⁶ Tyto procesy lze zpomalit přidávkou chloridových iontů (*cis*-Pt se rozkládá v prostředí s nízkým obsahem Cl^- - pod 0,45 % NaCl) a chráněním roztoku před světlem.²⁷ Fyzikální a chemická stabilita po naředění do infuzních roztoků o koncentracích 50 mg/l a 200 mg/l byla doložena na 72 hodin při teplotě 25 °C za současného chránění před světlem.²⁸

Kolem 270 °C se *cis*-Pt za černání rozkládá.²⁵ Vytváří černé precipitáty s hliníkem, též se nesmí dostat do styku se sírou.²⁷

S dimethylsulfoxidem (DMSO), ve kterém se sice snadno rozpouští, vytváří ale už po pěti minutách komplex se sníženou cyto- a neurotoxicitou. Po třech hodinách je již všechna *cis*-Pt vyvázána v neúčinném komplexu. Z tohoto důvodu by pacientům neměl být podáván roztok *cis*-Pt v DMSO (předpokládaný synergistický efekt obou látek nebyl potvrzen).²⁹

Cytotoxické, mutagenní a teratogenní vlastnosti *cis*-Pt vyžadují při manipulaci použití ochranných pomůcek. Substance se inaktivuje tepelným rozkladem při 800 °C nebo zředěním velkým objemem vody na 48 hod, kdy dojde k rozkladu hydrolytickému.³⁰

Farmakokinetika

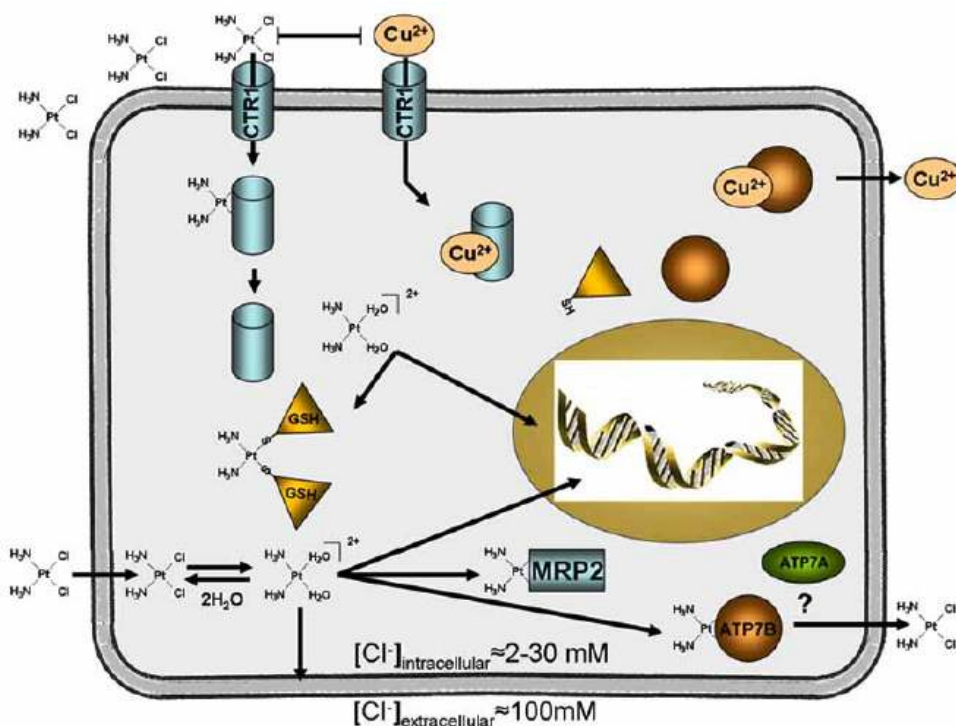
Distribuce

Po aplikaci se *cis*-Pt významně (z 90-98 %) váže na plazmatické a tkáňové bílkoviny, tato vazba se v zásadě jeví jako ireverzibilní (reaguje se sírou nebo thiolovými skupinami přítomnými v aminokyselinách, např. cysteinu, tvořících proteiny). To přispívá k akumulaci *cis*-Pt v těle – i po šesti měsících po poslední dávce byla v mnohých tkáních její přítomnost prokázána. Nejvyšší koncentrace léčiva byly nalezeny v ledvinách, játrech a prostatě, o něco nižší koncentrace byly zjištěny v močovém měchýři, svalch,

^a <http://mondinvisibili.files.wordpress.com/2011/01/cisplatin-2d.png>

varlatech, slinivce a slezině. Proniká také do tenkého a tlustého střeva, nadledvin, srdce, plic, lymfatických uzlin, štítné žlázy, žlučníku, thymu, vaječníků a dělohy, v malé míře i do bílých a červených krvinek. Nízké hladiny byly pozorovány též v CNS (velký mozek, mozeček), naproti tomu v intracerebrálních nádorech byly zjištěny významné hladiny léku.²⁸

Přesný mechanismus přestupu *cis*-Pt buněčnou membránou zatím zůstává nejasný. Zdá se, že hlavním procesem průniku je pasivní difúze, ke které přispívá též aktivní transport pomocí proteinu CTR1, přenašeče mědi (viz obr. 2).



Obr. 2 Schematické znázornění influxu a effluxu *cis*-platiny pomocí pasivní difúze a přenašeče CTR1³²

Již při průchodu membránou se *cis*-Pt může navázat na nukleofilní centra jiných molekul, která obsahují atomy dusíku nebo síry (např. fosfolipidy, fosfatidylserin). Tento proces pokračuje i v cytoplasmě, kde vytváří komplexy s mikrotubuly, peptidy a proteiny, RNA... Bylo pozorováno, že pouze 5-10 % *cis*-platiny proniknuvší do buňky se naváže na jadernou DNA, zatímco 75-85 % léčiva se váže na jiné nukleofilní součásti buňky.³¹

Metabolismus

Metabolizace *cis*-Pt na neaktivní produkty probíhá pomocí neenzymatické konverze. Plazmatický poločas je bifázický – úvodní činí 25-49 minut, postdistribuční 58-73 hodin.

Exkrece

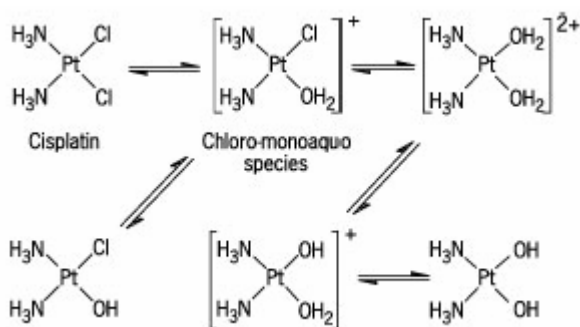
Hlavním eliminačním mechanismem je vylučování močí. Exkreční fáze je díky masivní vazbě na bílkoviny prodloužená a neúplná. Během prvních pěti dnů po podání nastává kumulativní močová exkrece 27 až 43 % dávky.²⁸

Farmakodynamika

Cis-Pt a její deriváty se řadí k alkylačním cytostatikům (= látky inhibující buněčnou proliferaci). Cílem alkylace je jaderná DNA, v menší míře i RNA.

Mechanismus účinku

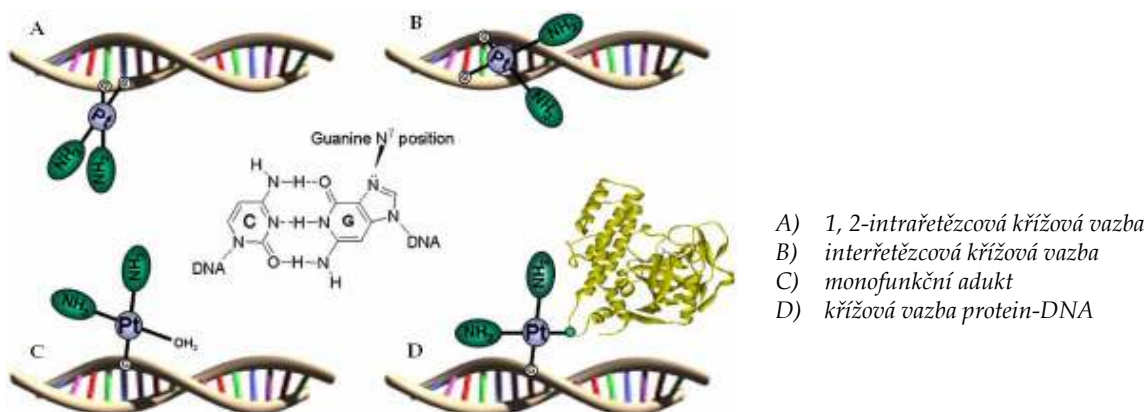
Po přechodu z plasmy do buňky jsou chloridové skupiny *cis*-Pt nahrazeny molekulami vody a následně -OH skupinami, čímž vznikají velmi reaktivní meziprodukty (viz obr. 3), které napadají nukleofilní centra molekul přítomných v buňce, mezi nimi i jadernou DNA – hlavní místo účinku.



Obr. 3 Vznik reaktivního komplexu reverzibilní reakcí v prostředí s nízkou $c \text{Cl}^-$ ³³

Ze vznikajících kladně nabitých komplexů se jako nejvýznamnější - z hlediska interakce s DNA za fyziologického pH - jeví diamminaquachlorplatnatý kation. Navzdory tomu je pravděpodobné, že *cis*-Pt proniká jadernou membránou jako neutrální nenabitý komplex. Zatím není známo, zda se jako při přechodu buněčnou membránou uplatňuje i zde pasivní difúze.

Ihned poté, co se v jádře vytvoří aktivní platinový kation, reaguje s nukleofilními místy purinových bází v DNA. Nejčastějším místem vazby je pro svou nukleofilitu a přístupnost N7 guaninu, pro adenin má *cis*-Pt menší afinitu.³² Nejprve se vytváří monofunkční adukty s DNA (ty jsou považovány za neaktivní - jak bylo pozorováno v pokusech s bakteriemi, tyto adukty nejsou schopny ukončit syntézu RNA bakteriální RNAPolymerasou podle DNA templátu). Zbývající chloridový ligand *cis*-Pt je poté hydrolyzován, vzniklý meziprodukt reaguje s dalším nukleofilním centrem DNA nebo proteinu. Výsledkem jsou intra- a interřetězcové křížové vazby mezi vlákny DNA (viz obr. 4).

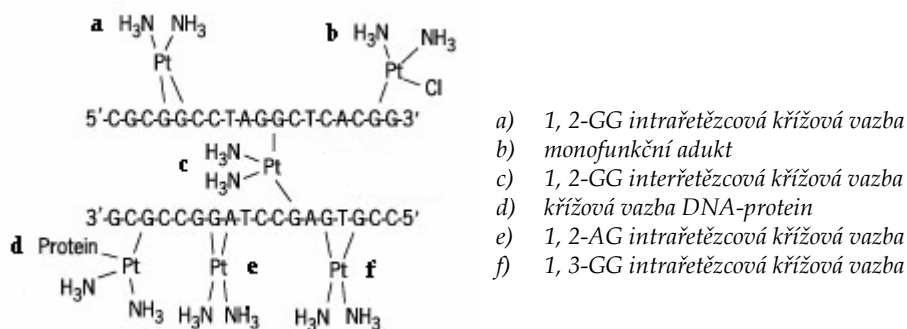


Obr. 4 Hlavní adukty vznikající vazbou *cis*-Pt na DNA³³

Mezi intrařetězcovými vazbami byly zjištěny 1, 2- i 1, 3-křížové vazby. Nejvíce, 85-90 %, je vazeb typu 1, 2-GG a AG (z toho 60-65 % GG, 20-25 % AG). Vazeb 1, 3-GXG (kde X je jakýkoli nukleotid), interřetězcových GG vazeb a monofunkčních aduktů se vytváří 2-6 %. Křížových vazeb typu AXG vzniká zanedbatelné množství (viz obr. 5).

Preferenčně v 5'-G-C3' sekvencích obou řetězců lineární DNA se tvoří 1, 2-interřetězcové vazby mezi protilehlými guaninovými bazemi (opačné sekvence, tedy 5'-G3', jsou preferovány mitomycinem C). Tato preference je pravděpodobně způsobena relativně krátkou vzdáleností mezi protilehlými guaniny v G-C sekvencích. Ovšem interřetězcové křížové vazby se v superhelikální DNA tvoří jak v sekvencích G-C, tak i v C-G, což naznačuje, že topologie DNA může regulovat vazbu léčiva mezi řetězci.

Z dosavadního výzkumu vyplývá, že nejvýznamnější cytotoxický efekt mají intrařetězcové vazby (především typu 1, 2), menší vazby interřetězcové. Adukty *cis*-Pt s DNA a proteiny cytotoxický účinek nemají (tyto adukty ve velké míře vytváří klinicky neaktivní *trans*-Pt, která také není schopna tvořit intrařetězcové vazby).^{32, 33}



Obr. 5 Typy aduktů a křížových vazeb³²

Jedním z nejdůležitějších nejaderných cílů je pravděpodobně glutathion (GSH) a některé další molekuly obsahující thiolové skupiny, jako např. metalothioneiny. Vazbou na enzymy a receptory může *cis*-Pt ovlivnit jejich funkci: in vitro byla prokázána inhibice aktivity Hsp90 (heat shock protein 90, ATP vázající chaperon), nadto specificky blokuje jeho C-koncové ATP vázající místo, které se svou ATP-hydrolytickou funkcí účastní správného prostorového uspořádání proteinů. Ty mj. hrají roli v signální transdukcii a regulaci buněčného cyklu. Vazba na methionin v pozici 1 a/nebo histidin v pozici 68 molekuly ubikvitinu může inhibovat ubikvitin-proteázomovou cestu selektivní degradace buněčných proteinů, což má za následek cytotoxické projevy.³³

Oprava poškození DNA způsobeného *cis*-platinou

Buňky disponují několika mechanismy, které jsou schopné rozeznat a opravit nejruznější typy poškození DNA a předejít tak apoptóze. Prozatím bylo identifikováno více než dvacet proteinů rozeznávajících poškození, z nichž některé vykazují specifičnost pro adukty DNA-*cis*-Pt a jejich analogů [např. high mobility group 1 protein (HMG1 protein)³⁴, TATA-binding protein (TBP)³⁵ a další].

Mezi nejdůležitější mechanismy, které buňka využívá k odstraňování aduktů DNA-*cis*-Pt, patří NER, MMR a oprava zprostředkovaná DNA-dependentní proteinkinasou.

(Ta má svou hlavní úlohu při opravě dvouřetězcových zlomů, ale interaguje i s poškozením indukovaným vazbou *cis*-Pt na DNA.³⁶⁾

Pokud se buňce nepodaří poškození opravit, je spuštěna některá ze signalizačních kaskád vedoucí ve svém důsledku k apoptóze.

Účinky

Platinová cytostatika jsou jak druhově, tak fázově nespecifická – působí na všechny především rychle se dělící buňky, nádorové i zdravé, ve všech fázích buněčného cyklu. Vznikající křížové vazby způsobují lokální rozvinutí a ohýbání dvoušroubovice DNA (intrařetězcové vazby rozvíjí DNA o 13-23 °, ohýbají ji o 32-34 °³⁷; interřetězcové ji rozvíjí o 79 ° a více, ohýbají ji o 45-47 °³⁸). Blokují tím replikaci DNA a/nebo zabraňují transkripci DNA do RNA. Na cytotoxickém účinku vedoucím ve svém důsledku k apoptóze se podílí také vazba *cis*-Pt na proteiny a další součásti buňky, které takto mohou ztratit svou biologickou funkci.³³

Vedlejší a nežádoucí účinky

Mezi nejčastější vedlejší a nežádoucí účinky patří nauzea a zvracení (často opožděné, s vrcholem nastupujícím po 48-72 hodinách), útlum krvetvorby – leukopenie, trombocytopenie (ty dosahují maxima za 18-23 dní po užití léčiva), anémie, po aplikaci vysokých dávek je výrazná myelosuprese, zvýšený výskyt infekčních onemocnění. Neurotoxické nežádoucí účinky zahrnují především periferní parestezie, dále ztrátu reflexů, epileptické paroxysmy, vzácně svalové křeče. Ototoxicita se projevuje nejčastěji tinnitem, poruchami rovnováhy, ztrátou sluchu v rozsahu vysokých frekvencí. Dále se projevuje nefrotoxita, hyperurikémie, urátová nefropatie, hypomagnezémie; méně často nechutenství, anafylaktická reakce; vzácně stomatitida, toxické poškození zraku (zastřené vidění, snížení schopnosti rozeznávat barvy, především modrou a žlutou), syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu. Jako u jiných cytostatik i zde hrozí riziko sekundárních malignit.³⁹

Ochrana proti nežádoucím účinkům

Cis-Pt je podle podané dávky středně až vysoce emetogenní. Emezi u 30-90 % pacientů způsobují dávky pod 50 mg/m², dávky 50 mg/m² nebo vyšší vyvolávají nauzeu a zvracení u více než 90 % léčených. Při použití vysoce emetogenní dávky se profylakticky podává aprepitant, antagonisté serotoninu na 5-HT₃ receptorech (setrony: ondansetron, granisetron, palonosetron) spolu s dexamethasonem. Při podání středně emetogenní dávky *cis*-Pt v některých případech postačuje kombinace setronů s dexamethasonem.

Nefrotoxita se omezuje dostatečnou hydratací pacienta 1,5-2 l fyziologického roztoku podaných intravenózně 2-12 hodin před infuzí léčiva. Náležitou hydrataci a diurézu (s pomocí mannitolu) je třeba zajistit i následujících 24 hodin. Před a při intraperitoneální aplikaci *cis*-Pt se jako antidotum používá thiosíran sodný, který umožňuje zvýšit dávku léčiva (v krvi uvolňuje volné -SH skupiny, s kterými *cis*-Pt reaguje, vzniká netoxický komplex).

Ke snížení rizika vzniku závažné neutropenie při kombinované terapii *cis*-Pt a cyklofosfamidem a jako profylaxe nefrotoxicity *cis*-Pt se používá amifostin.

Strategie léčby

Roztok léčiva naředěný na požadovanou koncentraci (mg/m^2) dle druhu nádoru se aplikuje intravenózní infuzí trvající 6-8 hodin (lze ji zkrátit na 60-120 min, je-li týž den podáváno další cytostatikum). Délka cyklu a počet aplikací v jednom cyklu, případně kombinace s jinými antineoplastiky, se opět řídí druhem nádoru.

Další cyklus chemoterapie je možno zahájit až po normalizaci krevního obrazu (počet leukocytů vyšší než $4\,000/\text{mm}^3$, počet trombocytů vyšší než $100\,000/\text{mm}^3$) a případných projevů toxicity.

Kontraindikace

Léčivo je kontraindikováno při přecitlivělosti na *cis*-Pt, v graviditě a při laktaci. Pro nedostatek zkušeností se nepodává dětem. U pacientů s útlumem krvetvorby, těžšími poruchami funkce ledvin nebo sluchu či trpícími infekčními onemocněními je třeba při terapii *cis*-Pt zvýšené opatrnosti.

Při léčbě a nejméně tři měsíce po jejím ukončení nesmí být pacient očkován živými atenuovanými vakcínami.

Interakce

Cis-Pt snižuje jak plazmatické hladiny, tak i účinek karbamazepinu, jen plazmatickou hladinu snižuje u fenytoinu. Nefrotoxicita a ototoxicita je zvýšena při použití dalších nefro- a ototoxických léčiv.³⁹

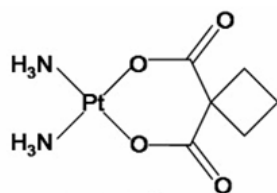
Rezistence

Rezistence k léčivu může být přirozená nebo získaná. Přirozená rezistence souvisí s polymorfismy genů kódujících proteiny, které se účastní opravy poškození DNA, či nadměrnou expresí těchto proteinů v nádorových buňkách. Získaná rezistence se vyvíjí u některých nádorů po opakovaném podávání, v tom případě se terapie *cis*-Pt ukončuje a přechází se na jiné cytostatikum či jejich kombinaci.

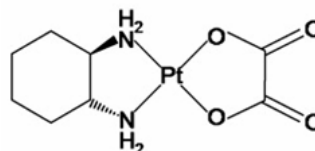
Další deriváty platiny

Druhou generaci platinových cytostatik tvoří karboplatina (*cis*-diammin[cyklobutan-1, 1-dikarboxylát-(2)-*O,O'*]platnatý komplex; viz obr. 6) schválená roku 1989. Skupina 1, 1-cyklobutandikarboxylu je stabilnější než chloridová, tím se podařilo snížit toxicitu bez ovlivnění antitumorové aktivity – karboplatina je mnohem méně nefrotoxická, méně neutotoxická, také GIT toxicita je snížena (myelosuprese a trombocytopenie je závislá na dávce).

Oxaliplatina (viz obr. 7) byla schválena roku 2002. Obsahuje 1, 2-diamminocyklohexylový ligand; v kombinaci s 5-fluorouracylem a leukovorinem se používá k léčbě kolorektálního karcinomu. Její významnou vlastností je zachovaná aktivita k některým typům nádorových buněk s přirozenou nebo získanou rezistencí vůči *cis*-Pt.⁴⁰

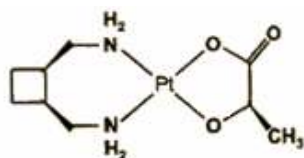


Obr. 6 Strukturní vzorec karboplatiny²³

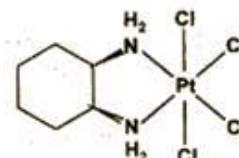


Obr. 7 Strukturní vzorec oxaliplatiny²³

Zástupcem třetí generace je lobaplatina (viz obr. 8) – analog oxaliplatiny, kde je aniontovým ligandem kyselina mléčná, s vyšší účinností a nižší toxicitou a ormaplatina (viz obr. 9), komplex Pt^{4+} ,²⁶

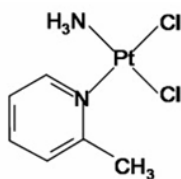


Obr. 8 Strukturní vzorec lobaplatiny^b

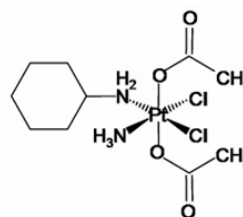


Obr. 9 Strukturní vzorec ormaplatiny^b

Ve třetí fázi klinického zkoušení pro léčbu malobuněčného plicního karcinomu je pikoplatina (viz obr. 10) lišící se od *cis*-Pt 2-pikolinem na místě aminového ligandu. O satraplatině (komplexu Pt^{4+} , viz obr. 11) se uvažuje jako potenciálním léčivu pro hormonálně refrakterní rakovinu prostaty. Její nespornou výhodou je aktivita po perorálním podání. Od *cis*-Pt se liší cyklohexylaminem na místě aminu a dvěma acetátovými ligandy v axiální pozici.



Obr. 10 Strukturní vzorec pikoplatiny²³



Obr. 11 Strukturní vzorec satraplatiny²³

Intenzivní výzkum se provádí též s platinovými komplexy, které mají *trans* geometrii nebo obsahují více platinových center. V budoucnu by se některé z nich také mohly uplatnit v klinické praxi.²³

^b http://hemija.chem.bg.ac.rs/g38_1997/strana078.htm

2. CÍL – ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat poškození DNA kometovým testem a sledovat jeho opravu s konkrétním zaměřením na sledování indukce a reparace křížových vazeb způsobených *cis*-Pt u sedmi buněčných linií.

Citlivý a přesný kometový test vhodný k monitorování genotoxických účinků byl doplněn MTT testem, aby bylo možno sledovat, jak různé buněčné linie odolávají indukovanému poškození.

K experimentům byly vybrány jak linie s intaktními reparačními mechanismy (A-549, HeLa, HELF a CHO AA8), tak linie deficitní v určitých genech důležitých pro opravu poškozené DNA (CHO UV-20, XPA a XPC) s cílem porovnat u nich množství křížových vazeb a jejich reparaci po inkubaci trvající 24 hodin.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Pomůcky a přístroje

- analytické váhy: Boeco, Německo
- autokláv: Tuttnauer 2540 M, Tuttnauer, Izrael
- automatické pipety: Labmate - HTL, Polsko
Microman - Gilson, Francie
- Bürkerova komůrka: Meopta Přerov, ČR
- centrifuga: Hermle Z400K - Hermle Labortechnik, Německo
- CO₂ incubator mod. 2323-2 - Shel Lab, USA
- časový spínač k dvouzdroji: VIPO Elcon - Znak Malá Skála, ČR
- elektroforetický tank, vlastní konstrukce
- fluorescenční mikroskop: Eclipse E400 - Nikon, Japonsko
- laboratorní dvouzdroj: F 100, vlastní konstrukce
- laboratorní sklo: P-Lab, ČR
- laminární box: Aura 2000 M. A. C. - BIOAIR instruments, Itálie
- lednice: Calex 175R - Zanussi Itálie
lednice s mrazákem Liebherr, Německo
- magnetická míchačka s ohřevem: MM 4 - Lavat, ČR
MSH basic - IKA-Werke, Německo
- Microsoft Office Excel 2003 - Microsoft, USA
- mikrotitrační destičky (96 jamek): P-Lab, ČR
- mikrovlnná trouba KOR-6L05 - Daewoo, Jižní Korea
- mikrozkuhavky eppendorf: P-Lab, ČR
- multikanálové pipety: Labmate - HTL, Polsko
Discovery Comfort - HTL, Polsko
- operační systém: Windows XP 2001 - Microsoft, USA
- Pasteurovy pipety: P-Lab, ČR
- počítač: Hewlett Packard, USA
- podložní a krycí sklíčka: Hirschmann Laborgeräte, Německo
- přístroj k výrobě tridestilované vody: LTHS 2000 - Brněnská drutěva v. d., ČR
- spektrofotometr: Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader - BioTek Instruments Inc., USA
- software pro obrazovou analýzu: LUCIA® Comet Assay (Single stain) verze 4.81 (Build 137) 1991-2005 - Laboratory Imaging Ltd., Praha, ČR
- software pro spektrofotometrické hodnocení: Gen5, BioTek Instruments Inc., USA
- světelný inverzní mikroskop: ELWD 0,3/OD75 T1-SNCP - Nikon, Japonsko

- špičky na pipety: Gilson – Kartell S. p. A., Itálie
- třepačka na mikrotitrační destičky: MS 3 digital, IKA, USA
- videokamera: CCD BW - Laboratory Imaging, ČR
- vodní lázeň: 609A - MTA Kutesz, Maďarsko
- výrobce ledu a ledové tříště: GET 43445 - Angelantoni, Itálie
- zkumavky: Sarstedt, Německo

3.2. Chemikálie

- α -MEM (α -Modified Eagle's Essential Medium, α -modifikace Eagleova základního média): PAA Laboratories, Rakousko
- agaróza Serva standard EEO: Serva Electrophoresis GmbH, Německo
- agaróza typ I (high gelling temperature, HMP = high melting point): Sigma-Aldrich, USA
- agaróza typ VII (low gelling temperature, LMP = low melting point): Sigma-Aldrich, USA
- *cis*-platina (*cis*-Pt; *cis*-diammin-dichloroplatnatý komplex): Sigma-Aldrich, USA
- dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma-Aldrich, USA
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Dulbeccova modifikace Eagleova média) High Glucose (4,5 g/l) with L-glutamine and Sodium Pyruvate: PAA Laboratories, Rakousko
- ethidium bromid 95%: Sigma-Aldrich, USA
- ethylendiammintetraoctová kyselina (chelaton II, EDTA) p. a.: Penta Praha, ČR
- fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS = Phosphate buffered saline): Sigma-Aldrich, USA
- fetální bovinní sérum (FBS = Fetal Bovine Serum): PAA Laboratories, Rakousko
- HCl p. a.: Penta Praha, ČR
- isopropanol (2-propanol): Sigma-Aldrich, USA
- MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-difenyltetrazolium bromid]: Sigma-Aldrich, USA
- NaCl p. a.: Lach: Neratovice, ČR
- NaOH p. a.: Penta Praha, ČR
- roztok antibiotik (atb) – penicilin a streptomycin (100x), 10 000 units/10 mg/ml in normal saline: PAA Laboratories, Rakousko
- styrenoxid (SO): Fluka, Švýcarsko
- tridestilovaná voda vlastní výroby
- tris(hydroxymethyl)aminomethan p. a.: Penta Praha, ČR
- Triton X-100: Serva Electrophoresis GmbH, Německo
- trypsin: PAA Laboratories, Rakousko

3.3. Příprava roztoků

pro přípravu roztoků byla použita tridestilovaná voda (není-li uvedeno jinak)

agaróza:

na potahování sklíček 1% roztok

agaróza	1 g
voda	100 ml

HMP agaróza 1% roztok

HMP agaróza	100 mg
PBS	10 ml

LMP agaróza 1% roztok

LMP agaróza	100 mg
PBS	10 ml

roztok styrenoxidu:

SO	9,6 μ l
DMSO	490,4 μ l

roztok cis-platiny:

cis-Pt	2,0 mg
DMEM	10 ml

příprava probíhá sterilně

roztok PBS:

zásobní tableta	1
voda	200 ml

roztok sterilizovat v autoklávu

lyzační roztok:

pH = 10

NaCl	146 g
EDTA	29,2 g
tris(hydroxymethyl)aminomethan	1,2 g
voda	do 1000 ml

přesné hodnoty pH se dosahuje přidáním NaOH (asi 12 g do 1 l)

před použitím k tomuto roztoku přidat Triton X-100 tak, aby vznikl jeho 1% roztok (1 ml do 100 ml již připraveného roztoku)

směs poté důkladně zamíchat a zchladit na 4 °C

roztok 0,5 M EDTA:

EDTA	14,612 g
voda	100 ml

pH upravit na hodnotu 10 přidávkem NaOH

elektroforetický pufr:

NaOH	12 g
0,5 M roztok EDTA	2 ml
dvakrát destilovaná voda	do 1000 ml

NaOH rozpustit v části destilované vody, přidat 2 ml EDTA, doplnit vodou do 1000 ml

neutralizační roztok:

pH = 7,5

tris(hydroxymethyl)aminomethan	48,456 g
voda	do 1000 ml

tris(hydroxymethyl)aminomethan rozpustit v části vody, pH upravit na hodnotu 7,5 pomocí 36% HCl (přibližně 25 ml do 1000 ml)

roztok doplnit do 1000 ml a provést případnou korekci pH

roztok ethidium bromidu:

ethidium bromid	2 mg
voda	5 ml

z tohoto roztoku odebrat 250 µl do 5 ml vody (konečná koncentrace 20 µg/ml vody)

médium pro kultivaci buněčných linií A-549, XPC, XPA, HeLa, HELF:

DMEM	500 ml
FBS	50 ml
atb	5 ml

médium pro kultivaci buněčných linií CHO-UV 20, CHO-AA8:

α-MEM	500 ml
FBS	25 ml
atb	5 ml

roztok MTT:

MTT	0,5 g
PBS	100 ml

po rozpuštění sterilně přefiltrovat, alikvoty po 1,3 ml ve sterilních mikrozkuvkách zamrazit

solubilizační roztok:

na 500 ml roztoku

2-propanol	480 ml
voda	20 ml
Triton X-100	250 µl
36% HCl	17,16 µl

3.4. Metody

3.4.1. Kometový test (Comet assay)

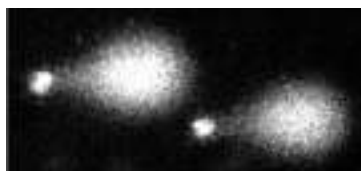
Kometový test (single cell gel electrophoresis, SCGE) je rychlou, jednoduchou a dostatečně senzitivní metodou k zjištění poškození DNA a to na úrovni jednotlivých buněk.⁴¹ Kombinuje jednoduchost biochemických technik používaných k detekci jednořetězcových zlomů DNA, alkalilabilních míst a křížových vazeb s přístupem typickým pro cytogenetické testy, tedy individuálním hodnocením každé jednotlivé buňky.

Mezi hlavní výhody kometového testu patří hodnocení poškození DNA v každé buňce, vysoká citlivost, aplikovatelnost na jakoukoli eukaryotickou buněčnou linii *in vitro* (včetně buněk rostlinných⁴²) i *in vivo*. K provedení testu postačuje relativně malé množství buněk (méně než 10 000).⁴³

Možnosti jeho využití jsou velmi široké: studium poškození DNA (jedno- i dvouřetězcové zlomy, křížové vazby, poškození bází, apoptotická jádra), opravy DNA, určení stupně fragmentace DNA přítomné ve spermiích⁴⁴, měření poškození DNA ve specifických genomových sekvencích⁴⁵, stanovení senzitivity nádorových buněk na radio- a chemoterapii^{46, 47}, atd. Metoda se používá také při ekogenotoxických studiích a monitorování životního prostředí.⁴⁸

Principem kometového testu je schopnost negativně nabitých fragmentů DNA v agarózovém gelu imobilizovaných a lyzovaných buněk migrovat při elektroforéze k anodě.⁴⁹ Míra migrace přímo závisí na poškození DNA přítomné v buňce. Zlomy řetězců DNA migraci zvyšují, zatímco křížové vazby, ať už mezi řetězcí DNA nebo mezi DNA a proteinem, ji zpomalují a zmenšují.⁵⁰ Vzniklé komety se vizualizují obarvením (ethidium bromidem, akridinovou oranží, někdy také stříbrem) a vyhodnocují manuálně nebo pomocí speciálního softwaru.

Počátky této metody sahají do roku 1976, kdy Cook se svým kolektivem publikoval práci zabývající se charakterizací nukleárních struktur obsahujících DNA. K lýzi buněk a odstranění většiny chromatinových proteinů využili roztok o vysoké koncentraci NaCl s přidavkem neionogenních detergentů o pH 8.⁵¹ Na tuto práci navázali Ostling a Johanson v roce 1984, přičemž lýzi buněk a následující elektroforézu prováděli za neutrálních podmínek. Po obarvení akridinovou oranží připomínala DNA kometu se zřetelnou hlavou, obsahující intaktní DNA, a ocasem, který byl tvořen fragmenty poškozené DNA (viz obr. 12).⁵² Odtud tedy název kometový test.



Obr. 12 Komety vizualizované ethidium bromidem

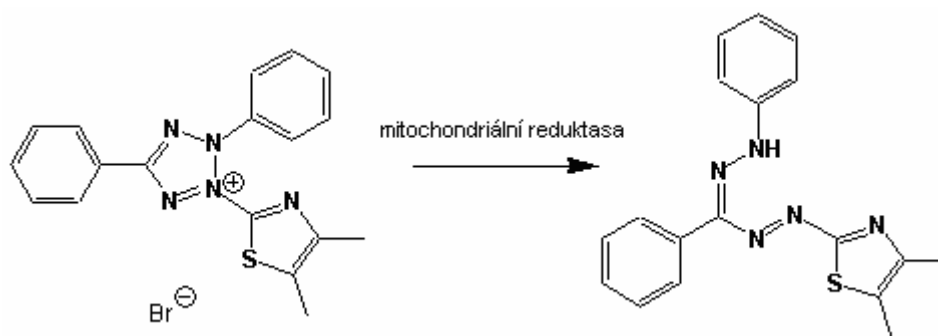
Univerzálnější alkalický kometový test s vysokou senzitivitou k měření nízkého počtu zlomů v DNA byl vyvinut roku 1988 Narendrou Singh a jeho spolupracovníky. K poškození DNA použili Roentgenovo záření a H₂O₂, buňky byly lyzovány v roztoku o pH 10, alkalická denaturace a elektroforéza byla provedena při pH vyšším než 13.⁴¹

V současné době se využívají dvě základní varianty kometového testu a to neutrální (pH 7-8) a alkalická (pH 12-13). K přesnějšímu posouzení poškození DNA bylo vyvíjeno několik modifikací SCGE. Ty spočívají v rozpoznání určitého typu defektu specifickým enzymem, což se projeví zlomy. Nejčastěji se k tomuto účelu používají endonukleasa III rozeznávající oxidované pyrimidiny, formamidopyrimidin-DNA-glykosylasa (FPG) rozpoznávající oxidované puriny, uracil-DNA-glykosylasa a další.

3.4.2. MTT test (MTT assay)

Tento laboratorní test patří do skupiny kolorimetrických metod, které obecně využívají Lambert-Beerova zákona ke stanovení koncentrace látky v roztoku měřením jeho absorbance. Pomocí MTT testu lze na stejném principu měřit enzymatickou aktivitu buněk, čehož se využívá ke stanovení jejich viability a proliferace, též se používá k posouzení toxicity nejrozličnějších látek (např. toxiny, antiproliferační léčiva, protilátky, polutanty).

Principem metody je redukce žluté tetrazoliové soli [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu, MTT] dehydrogenasami lokalizovanými v mitochondriích živých buněk na fialový formazan, jak ukazuje obr. 13. (V buňkách poškozených či mrtvých tyto dehydrogenasy již nejsou aktivní.) Ten jako nerozpustné krystaly zůstává v buňkách, přidavkem solubilizačního roztoku (dimethylsulfoxid – DMSO, okyselený ethanolický roztok nebo lauroylsírán sodný – SDS – ve zředěné HCl) se rozpustí. Pak je již možno změřit absorbanci vzniklého roztoku barviva, obvykle při vlnové délce mezi 500 až 600 nm.



Obr. 13 Redukce MTT na formazan^c

Rychlost tvorby a množství vzniklého formazanu je přímo úměrné aktivitě dýchacího řetězce, který zde reprezentuje celou metabolickou aktivitu buňky. Porovnáním absorbance vzorku s kontrolou (pozitivní – modelový toxin či Triton X-100, 0% životnost; negativní – pouze rozpouštědlo, 100% viabilita) se dá usuzovat na toxický efekt zkoumané látky.^{53, 54, 55}

^c <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mttscheme.png>

3.5. Pracovní postup

- ***příprava podložních sklíček***

Podložní sklíčka byla nejprve vařena třicet minut v 10% roztoku H_2O_2 a poté usušena. Tím byla připravena k nanesení souvislé vrstvy agarózy. Agaróza Serva standard EEO byla pomocí mikrovlnné trouby rozvařena v tridestilované vodě tak, aby vznikl její 1% roztok. Do tohoto roztoku o teplotě 80-85 °C byla sklíčka jednotlivě namáčena až po zmatovaný okraj, spodní strana byla po vytažení otřena. Následovalo sušení skel na vzduchu při laboratorní teplotě a poté v sušárně při 60 °C po dobu třiceti minut.

- ***kultivace buněk***

Buňky byly po rozmrazení suspendovány v médiu a pět minut centrifugovány, aby byly zbaveny DMSO, který byl použit při zmrazování jako prevence poškození buněk ledovými krystalky. Supernatant byl odlit a buňky byly resuspendovány v médiu, které bylo následně přelito do kultivačních lahví. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C, 85% vlhkosti, v atmosféře obsahující 5 % CO_2 .

- ***pasážování a nasazení buněk na Petriho misky***

Obě operace probíhaly za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním. Pasážování se opakovalo každé dva až tři dny podle intenzity nárůstu buněk. Médium, PBS i trypsin byly před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu.

Z kultivačních lahví bylo odsáto médium, proveden oplach PBS, následně byly buňky opláchnuty cca 3 ml trypsinu. Zhruba 2 ml trypsinu byly poté odebrány, zbytek v kultivačních lahvích byl na pět minut vrácen do termostatu. Sklepáním a oplachem byly buňky uvolněny z povrchu kultivační nádoby a resuspendovány v přidaném médiu. Čtyři pětiny suspenze byly odebrány do zkumavky k dalšímu použití, ke zbývajícím pětině bylo nalito čerstvé médium a láhev byla vrácena do termostatu k další kultivaci.

Buňky odebrané při pasážování byly promíchány, kapka této suspenze byla přenesena na Bürkerovu komůrku a pod světelným inverzním mikroskopem byly buňky spočítány. Buněčná suspenze byla poté naředěna médiem na požadované množství buněk na jednu misku, které bude následně nasazeno. Na předem očíslované Petriho misky bylo pipetováno 1,5 ml této suspenze. Buňky byly v termostatu inkubovány přes noc, aby došlo k adhezi na dno misky.

- ***ovlivnění buněk cis-platinou***

Vypočítaná navážka *cis*-Pt byla rozpuštěna v médiu s obsahem 1 % atb, bez přídavku FBS. Tento výchozí roztok o koncentraci 0,64 mM sloužil k přípravě koncentrační řady. Z ní bylo na misky pipetováno 500 μl , výsledná koncentrace na miskách tak byla 160, 80, 40 a 20 μM *cis*-Pt. Po jedné hodině inkubace v termostatu bylo médium s *cis*-Pt ze všech misek odsáto a nahrazeno 2 ml kompletního média (tzn. DMEM/ α -MEM, FBS a roztok atb) vytemperovaného na 37 °C. Poté byly buňky inkubovány po zbývajícím předepsanou dobu (3 a 23 hodin).

- **indukce alkalilabilních aduktů pomocí styrenoxidu (SO)**

Podle uspořádání experimentu (viz tabulka 1) bylo na polovinu misek s buňkami ve 2 ml média po 1-, 4- a 24hodinové inkubaci dávkováno 10 μ l roztoku SO v DMSO, výsledná koncentrace SO v kultivačním médiu tak dosáhla 800 μ M. Buňky byly s SO inkubovány třicet minut.

uspořádání experimentu:

čas [hod]	miska číslo	cis-Pt [μ M]	SO [800 μ M/30 min]	sklíčko číslo
1	1	0	x	1
	2	0	✓	2
	3	20	x	3
	4	40	x	4
	5	80	x	5
	6	160	x	6
1	7	0	x	7
	8	0	✓	8
	9	20	✓	9
	10	40	✓	10
	11	80	✓	11
	12	160	✓	12
4	13	0	x	13
	14	0	✓	14
	15	20	x	15
	16	40	x	16
	17	80	x	17
	18	160	x	18
4	19	0	x	19
	20	0	✓	20
	21	20	✓	21
	22	40	✓	22
	23	80	✓	23
	24	160	✓	24
24	25	0	x	25
	26	0	✓	26
	27	20	x	27
	28	40	x	28
	29	80	x	29
	30	160	x	30
24	31	0	x	31
	32	0	✓	32
	33	20	✓	33
	34	40	✓	34
	35	80	✓	35
	36	160	✓	36

Tabulka 1 Schéma pokusu

SO styrenoxid
 x SO nebyl přidán
 ✓ SO byl přidán

- **kometový test (Comet Assay; SCGE = single cell gel electrophoresis)**

Po indukci alkalilabilních aduktů byl proveden kometový test:

1. příprava buněčné suspenze

Kultivační médium bylo odsáto z misek a byl proveden oplach PBS. Buňky byly ze dna misek uvolněny dvouminutovým působením trypsinu o teplotě 37 °C a suspen-

dovány v PBS. Do mikrozkuřavky eppendorf umístěné v ledové třísti bylo odebráno 35 μ l této suspenze.

2. fixace buněk v agarózovém gelu

Na podložní sklíčka potažená souvislou vrstvou agarózy bylo pipetováno 85 μ l 1% roztoku HMP agarózy, kapka byla ihned překryta krycím sklíčkem a gel se nechal na chladicí plotěnce ztuhnout.

K buněčné suspenzi v mikrozkuřavce bylo přidáno 85 μ l 1% roztoku LMP agarózy, suspenze byla důkladně promíchána a 85 μ l jí bylo pipetováno na předem připravené podložní sklo s blokem HMP agarózy. Kapka byla ihned překryta krycím sklíčkem a gel se opět nechal na chladicí plotěnce ztuhnout.

3. lýze buněk

Po ztuhnutí gelu a odstranění krycích sklíčků byla podložní skla s buňkami imobilizovanými v agaróze narovnána do kyvety a zalita lyzačním roztokem o teplotě 4 °C. Lýze probíhala 60 minut za nepřístupu světla, při teplotě 4 °C.

4. alkalická denaturace DNA

Sklíčka byla přemístěna z lyzačního roztoku do horizontálního elektroforetického tanku s elektroforetickým puřrem o teplotě 4 °C. DNA byla denaturována 40 minut bez přístupu světla při teplotě 4 °C.

5. elektroforéza

Elektroforéza byla provedena ve stejném tanku ihned po denaturaci za nepřístupu světla při 4 °C po dobu 30 minut. Napětí bylo 25 V a proud 300 mA – přesné hodnoty proudu bylo dosaženo úpravou objemu puřru.

6. neutralizace

Po elektroforéze byla sklíčka vyskládána do kyvety, zalita neutralizačním roztokem a neutralizována ve třech cyklech po dobu 5 minut, poté byla sklíčka na 5 minut ponořena do tridestillované vody, následovalo sušení na vzduchu při laboratorní teplotě.

7. fluorescenční mikroskopie a obrazová analýza

Před hodnocením preparátů byl každý agarózový blok na sklíčku rehydratován deset minut v tridestillované vodě, obarven 20 μ l roztoku ethidium bromidu o koncentraci 20 μ g/ml a překryt krycím sklíčkem.

Hodnocení probíhalo pomocí fluorescenčního mikroskopu a softwaru LUCIA® comet assay – na každém mikroskopickém preparátu bylo vyhodnoceno poškození DNA u dvaceti pěti buněk.

8. Statistické vyhodnocení

Získaná data byla v programu Microsoft Excel statisticky zpracována – z naměřených hodnot % DNA v ohonu byla vypočtena střední hodnota a chyba střední hodnoty. Dále byl z vypočtených hodnot vytvořen sloupcový graf znázorňující % DNA v ohonu komety (% tail DNA) v závislosti na koncentraci *cis*-Pt. Míra inhibice migrace

fragmentů DNA a tedy snižování % DNA v ohonu poukazuje na přítomnost křížových vazeb v DNA.

Pro porovnání sledovaných časových intervalů a použitých buněčných linií mezi sebou byly naměřené hodnoty přepočteny na procenta kontroly, tedy buněk ovlivněných pouze SO (80-98 % DNA v ohonu). Z přepočtených hodnot byl dále vypočítán průměr a směrodatná odchylka – tyto hodnoty byly vyneseny do grafu jako relativní % DNA v ohonu (relative % tail DNA).

• **stanovení cytotoxicity po 24 hodinách (MTT Assay)**

a) nasazení buněk na mikrotitrační destičku

Buňky odebrané při pasážování byly promíchány, kapka této suspenze byla přenesena na Bürkerovu komůrku a pod světelným inverzním mikroskopem byly buňky spočítány. Buněčná suspenze byla poté naředěna médiem na požadované množství buněk na jednu jamku mikrotitrační destičky, které bude následně nasazeno. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo pomocí 12kanálové pipety za sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním pipetováno 150 μ l této suspenze. Buňky byly v termostatu inkubovány přes noc, aby došlo k adhezi na dno destičky.

b) ovlivnění buněk cis-platinou

Z roztoku cis-Pt, připraveného rozpuštěním navážky v médiu s obsahem 1 % atb, o koncentraci 0,64 mM byla naředěna koncentrační řada tak, aby výsledná koncentrace v jamkách byla 160, 80, 40 a 20 μ M. Do jamek bylo po odsátí média pipetováno 200 μ l každé ze čtyř připravených koncentrací podle níže uvedeného schématu (viz tabulka 2). Poté byly buňky inkubovány v termostatu po dobu jedné hodiny, po níž bylo médium s cis-Pt ze všech jamek odsáto a nahrazeno 200 μ l kompletního média (tzn. DMEM/ α -MEM, FBS a roztok atb) vytemperovaného na 37 °C. Následovala inkubace po dobu zbývajících 23 hodin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
C		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
D		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
E		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
F		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
G		cont	cont	20	20	40	40	80	80	160	160	
H												

Tabulka 2 Schéma dávkování roztoků v mikrotitrační destičce

contkontrola
20, 40, 80, 160..... koncentrace cis-Pt v μ M

c) MTT Assay

Po uplynutí 24 hodin bylo médium odsáto a do všech jamek bylo napipetováno 100 µl roztoku MTT v médiu předem vytemperovaného na teplotu 37 °C. Následovala 90 minutová inkubace, po které bylo médium s MTT odsáto do sucha a nahrazeno 100 µl solubilizačního roztoku. Obsah jamek byl poté důkladně promísen na třepače. Absorbance byla měřena při vlnových délkách 570 a 630 nm pomocí spektrofotometru Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader.

d) statistické vyhodnocení

K vyjádření výsledků byly použity hodnoty absorbance měřené v šesti replikátech ve vnitřních jamkách mikrotitrační destičky. Tyto hodnoty absorbance byly přepočteny na % kontroly, což jsou buňky neovlivněné *cis*-Pt představující 100% viabilitu. Z těchto šesti přepočtených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka průměru.

V programu Microsoft Excel byl poté vytvořen spojnicový graf znázorňující viabilitu buněk v závislosti na koncentraci *cis*-Pt.

3.6. Zkoumané buněčné linie:

A-549 jsou bazální epitelální buňky alveolárního adenokarcinomu 58letého muže bílého etnika. Linie byla vytvořena v roce 1972 D. J. Giardem et al.⁵⁶ Tato linie není deficitní v žádném genu významném pro reparaci DNA.

Epitelální **HeLa** buňky, první kontinuální buněčná linie⁵⁷, byly získány roku 1951 z agresivního cervikálního adenokarcinomu 31leté Afroameričanky Henrietty Lacksové.^{58, 59} Ani tyto buňky nejsou deficitní v genech významných pro reparaci DNA.

HELF (Human Embryonic Lung Fibroblasts) jsou virem SV-40 (human sarcoma virus-40) imortalizované netumorigenní diploidní buňky odvozené z plic hysterotomií získaných embryí. Byly připraveny v 80. letech 20 stol., mají normální funkci genu p53 a signálních cest opravy DNA.^{60, 61}

Linii **CHO** (Chinese Hamster Ovary) vytvořil Theodore T. Puck se svými spolupracovníky v roce 1957 z ovarí čínského křečka (*Cricetulus griseus*). V našich experimentech jsme zkoumali dva subklony těchto epitelálních buněk⁶²: **CHO AA8** a od nich odvozené **CHO UV-20** (na rozdíl od linie AA8 deficitní v genu *ERCC-1* /excision repair cross-complementation group/, který se účastní NER – protein jím kódovaný působí při opravě poškození DNA jako strukturně specifická endonukleasa štěpící DNA na 5' konci).^{63, 64}

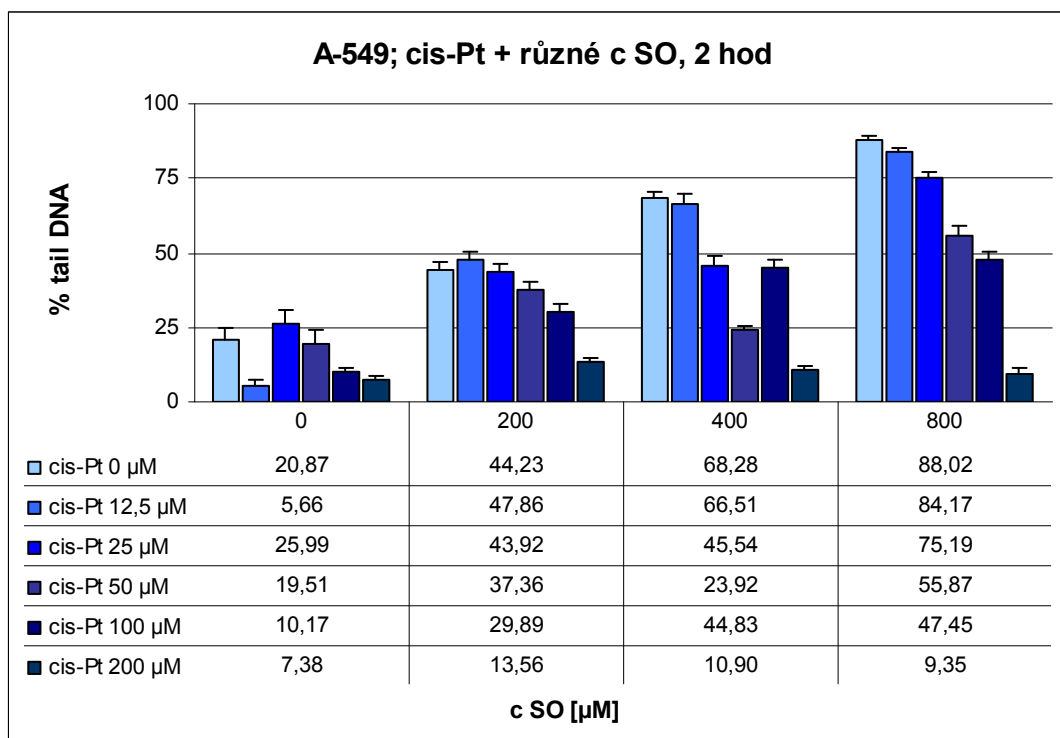
Na UV záření velmi citlivé **XPA** a **XPC** buňky (DNA repair protein complementing XP-A/C cells) jsou fibroblasty (např. myši) s poškozenou funkcí genu účastníčího se NER (Xeroderma pigmentosum complementation group A/C gene).⁶⁵ Protein kódovaný genem **XPA** ověřuje správné postavení dalších proteinů potřebných k opravě DNA, produkt genu **XPC** rozeznává poškození vytvořené UV zářením (spolu s proteinem kódovaným genem **XPE**; tyto dva proteiny se podílí na GGR – Global genome repair sub-pathway – což je typ NER, při kterém se odstraňují fotoadukty v netranskribující se DNA).⁶⁶

4. VÝSLEDKY

4.1. Stanovení optimální koncentrace SO pro detekci křížových vazeb

První ze série pokusů byl proveden za účelem zvolení nejvhodnější koncentrace SO, která bude použita k dalším pokusům – sledování tvorby a opravy křížových vazeb v DNA různých buněčných linií.

K pokusu byly vybrány buňky A-549, které byly po dvě hodiny vystaveny účinkům různých koncentrací roztoku *cis*-Pt v mediu (0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 μ M). Poté byly buňky inkubovány 30 min s různými koncentracemi SO (0, 200, 400 a 800 μ M). Následoval standardní kometový test s vyhodnocením poškození DNA. Výsledky jsou uvedeny v grafu 1.



Graf 1 Stanovení optimální koncentrace SO

Z výsledků kontroly vyplývá, že se zvyšující se koncentrací SO dochází k vyšší fragmentaci nepoškozené DNA a tedy k odhalení křížových vazeb způsobených vazbou *cis*-Pt na DNA. Tyto velké dukty inhibují migraci DNA během elektroforézy. Při ovlivnění buněk koncentrací 200 μ M *cis*-Pt je množství křížových vazeb již tak vysoké, že téměř veškerá DNA je lokalizována v hlavě komety a jen malá část zůstala nepoškozená, což se projevilo po působení SO (pouze 7,4 -13,6 % DNA v ohonu).

K dalším pokusům byla zvolena koncentrace 800 μ M SO, důvodem byl dostatečně vysoký počet zlomů v DNA – u kontroly neovlivněné *cis*-Pt je procento DNA v ohonu vyšší než 75 %.

4.2. Sledování indukce a reparace křížových vazeb v DNA různých buněčných linií

K dalším pokusům byly použity následující buněčné linie: A-549, HeLa, HELF, XPA, XPC, CHO AA8 a CHO UV-20. Na všech těchto liniích byl proveden experiment dle stejného schématu: buňky byly jednu hodinu inkubovány s různými koncentracemi roztoku *cis*-Pt v médiu (0, 20, 40, 80 a 160 μ M), poté byl roztok *cis*-Pt odstraněn a nahrazen kompletním médiem. Třetina vzorků byla ihned zpracována, třetina byla inkubována další tři hodiny, zbývající třetina byla inkubována po dalších dvacet tři hodin.

K detekci křížových vazeb byl použit roztok SO v DMSO o koncentraci 800 μ M působící 30 min, následoval standardní alkalický kometový test a vyhodnocení poškození DNA pomocí fluorescenčního mikroskopu a softwaru LUCIA® Comet Assay.

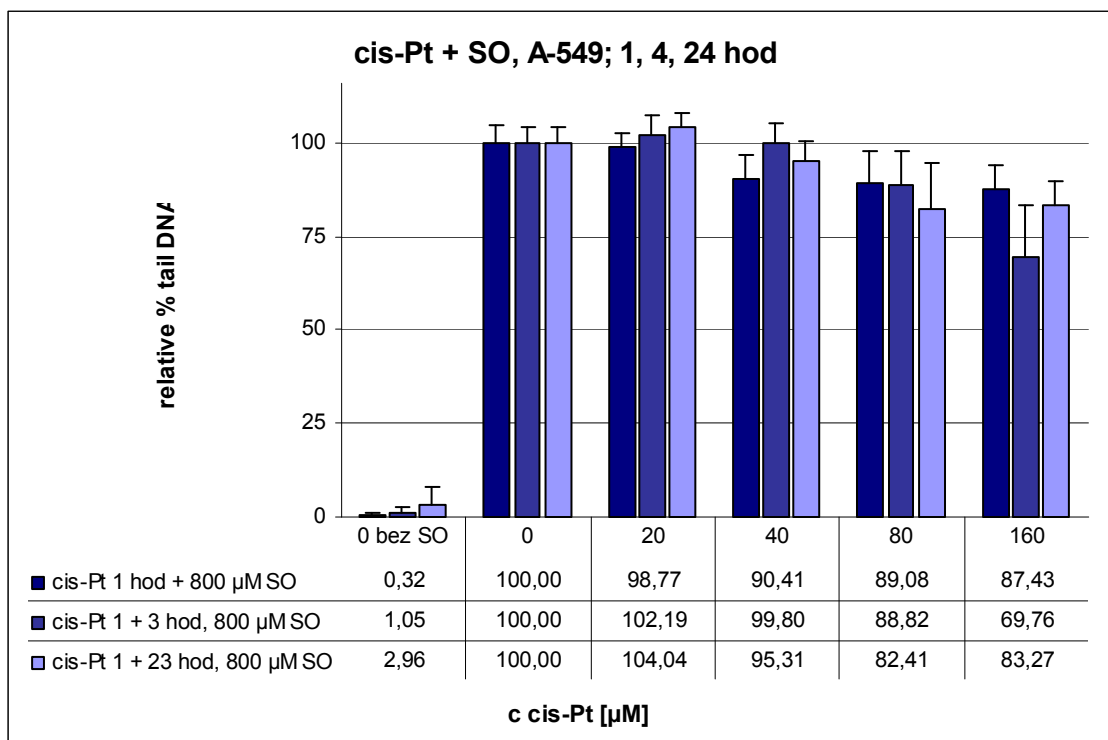
Získané absolutní hodnoty % tail DNA (% DNA v ohonu komety) byly přepočteny na relativní vzhledem ke kontrole ovlivněné pouze SO, která byla pro sledovaný interval považována za 100 %, a uvedeny ve sloupcovém grafu. Přepočet byl využit pro názornější a relevantnější porovnání výsledků všech sedmi buněčných linií.

Vliv alkylačního poškození DNA na buněčnou viabilitu a indukci apoptózy byl sledován pomocí testu MTT. Účinkům *cis*-Pt byly buňky vystaveny po dobu jedné hodiny, dalších 23 hodin byly inkubovány v kompletním čistém médiu. Relativní hodnoty viability (za 100 % byla považována kontrola neovlivněná *cis*-Pt) byly zaneseny do grafu spolu s relativními hodnotami % DNA v ohonu indukovanými po 24hodinové inkubaci pro snazší posouzení vlivu křížových vazeb na životaschopnost použitých buněčných linií.

Toto uspořádání experimentu umožňuje porovnat rozdíly v tvorbě křížových vazeb po jedné a čtyřech hodinách a sledovat jejich reparaci po dvaceti čtyřech hodinách u různých (lidských i zvířecích) buněčných typů a zároveň posoudit vliv cytotoxických vlastností *cis*-Pt na buněčnou viabilitu.

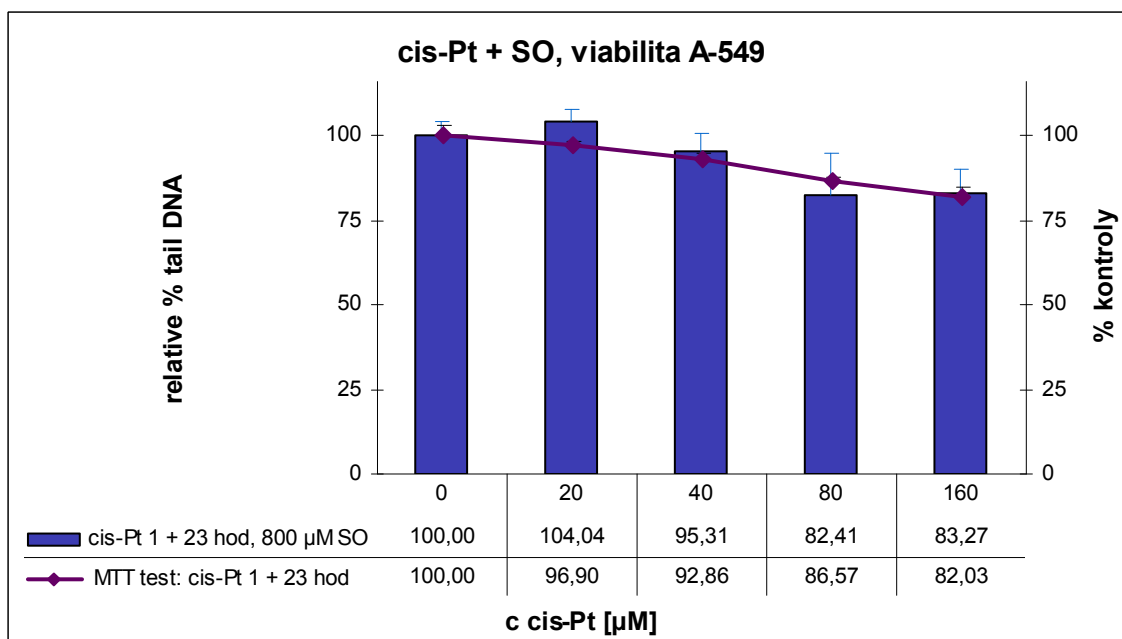
A-549

Graf 2 zobrazuje časovou a koncentrační závislost indukce a reparace křížových vazeb vyjádřenou v relativních hodnotách vzhledem ke kontrole (SO). V intervalu čtyři hodiny (jedna hodina inkubace s *cis*-Pt + tři hodiny inkubace v kompletním médiu) byl pozorován nárůst množství křížových vazeb u koncentrací 80 a 160 μ M *cis*-Pt (o 0,26 a 17,67 %). Po 24 hodinách bylo 44,68 % tohoto poškození u koncentrace 160 μ M *cis*-Pt opraveno (na 95,24 % hodnoty po jedné hodině), naopak u koncentrace 80 μ M *cis*-Pt ještě vzrostlo (o 7,45 % vzhledem k hodnotě po jedné hodině).



Graf 2 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

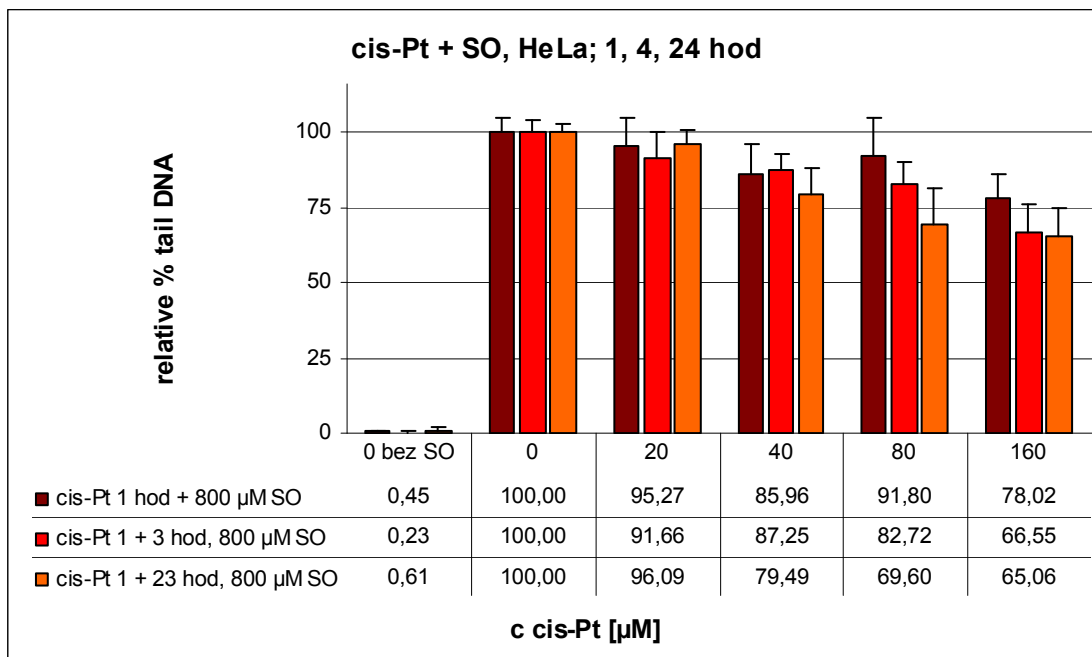
Graf 3 ukazuje množství křížových vazeb indukovaných *cis*-Pt po 24hodinové inkubaci a hodnoty buněčné viability korespondující s hodnotami % tail DNA. Při koncentracích 80 a 160 µM *cis*-Pt došlo ke snížení viability o 13,43; resp. 18 % - to ukazuje na koncentrace, při kterých se začínají projevovat cytotoxické vlastnosti *cis*-Pt.



Graf 3 Viabilita A-54 a křížové vazby po 24 hodinách

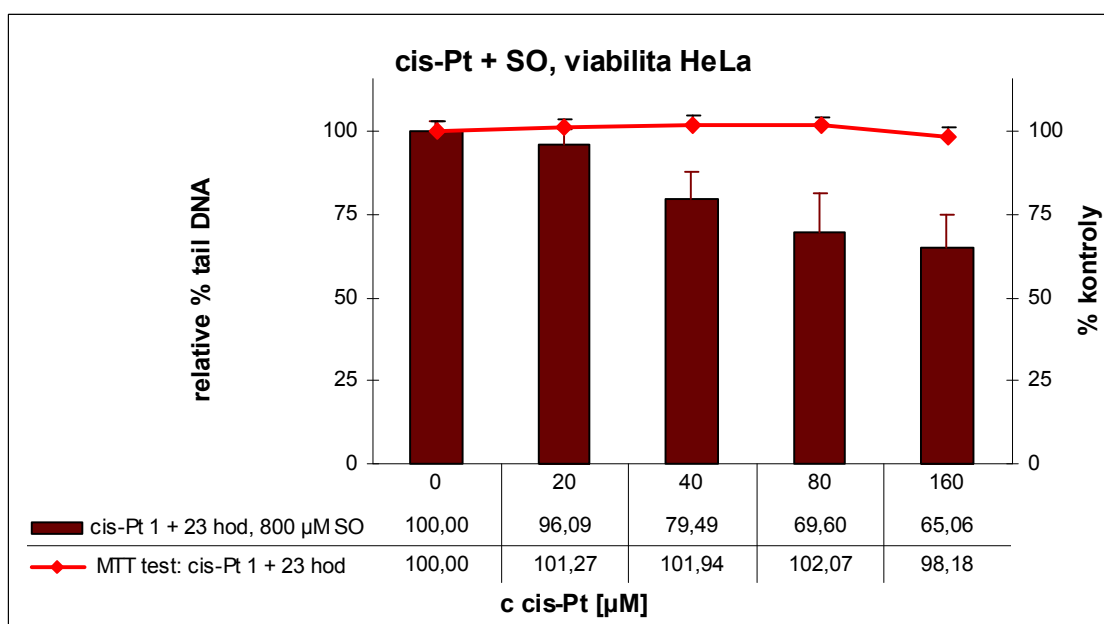
HeLa

V grafu 4 sledujeme časovou a koncentrační závislost indukce a reparace křížových vazeb. Po čtyřech hodinách je i zde patrný nárůst množství křížových vazeb u koncentrací 20, 80 a 160 μM *cis*-Pt (o 3,61; 9,08 a 11,47 %). Po 24 hodinách bylo toto poškození u koncentrace 20 μM opraveno, u ostatních koncentrací se ještě zvýšilo (o 7,76; 15,12 a 1,49 % vzhledem k hodnotě po čtyřech hodinách).



Graf 4 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

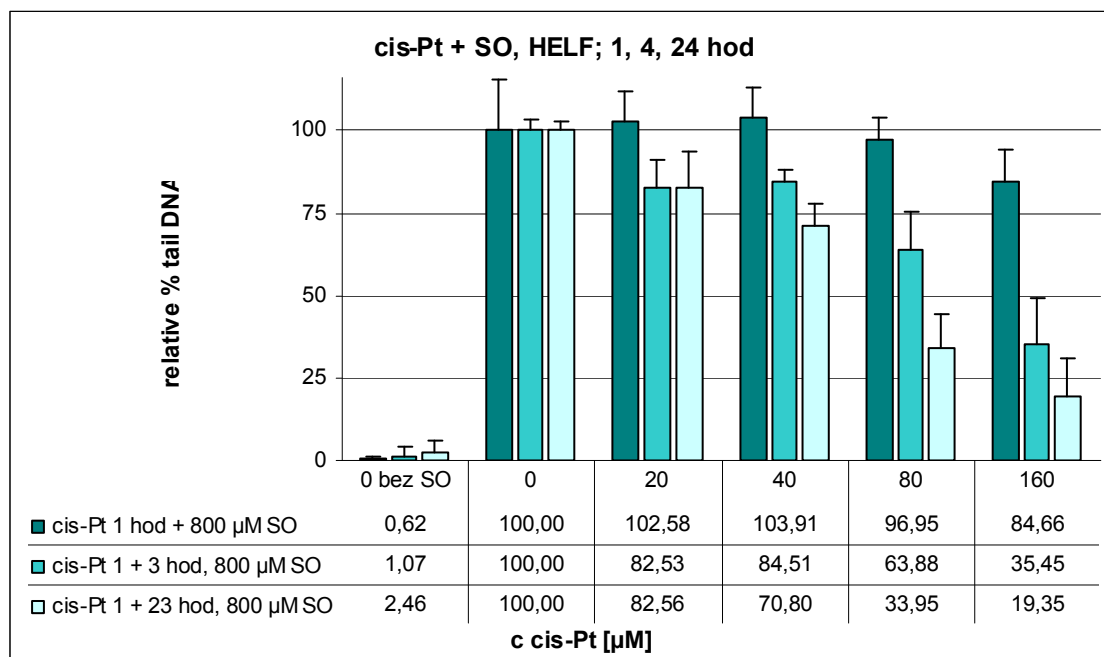
Hodnoty buněčné viability v grafu 5 v tomto případě téměř vůbec nekorrespondují s hodnotami % tail DNA. Při koncentraci 160 μM *cis*-Pt došlo ke snížení viability pouze o 1,82 %, při nižších koncentracích nebyla viabilita významněji ovlivněna.



Graf 5 Viabilita linie HeLa a křížové vazby po 24 hodinách

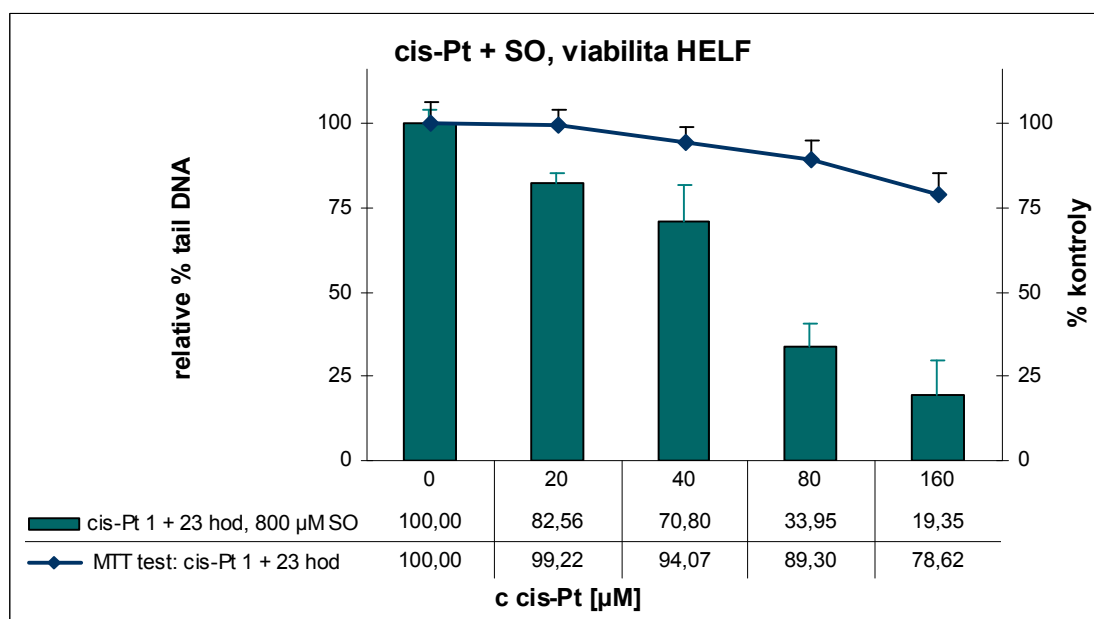
HELF

Indukci a reparaci křížových vazeb u linie HELF zobrazuje graf 6. Zde u všech koncentrací došlo po čtyřech hodinách k nárůstu množství křížových vazeb (u koncentrace 20 μM o 20,05 %; dále o 19,40; 33,07 a konečně u koncentrace 160 μM *cis*-Pt o 49,21 %). Po inkubaci s čistým médiem trvající 23 hodin bylo zjištěno další zvýšení tohoto poškození u koncentrací 40, 80 a 160 μM *cis*-Pt (o 13,71; 29,93 a 16,10 % vzhledem k hodnotě po čtyřech hodinách).



Graf 6 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

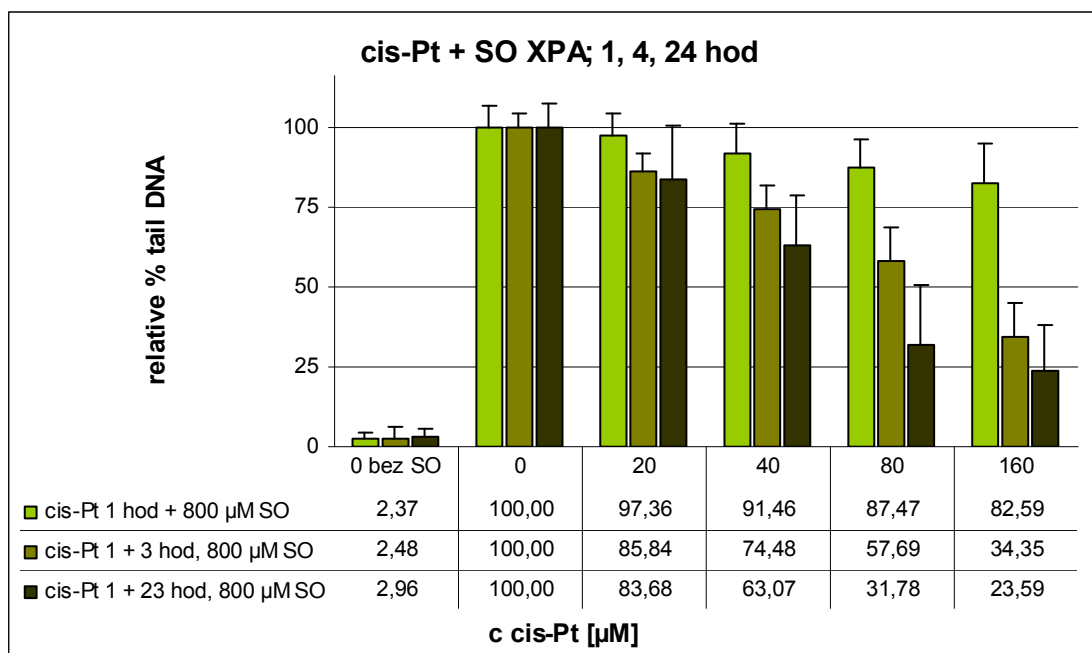
Navzdory velkému množství křížových vazeb není viabilita linie HELF ovlivněna tolik, jak by se dalo očekávat (viz graf 7). Koncentrace, při kterých se začínají výrazněji projevovat cytotoxické vlastnosti *cis*-Pt, jsou 80 a 160 μM *cis*-Pt (snížení viability o 10,7; resp. 21,38 %).



Graf 7 Viabilita linie HELF a křížové vazby po 24 hodinách

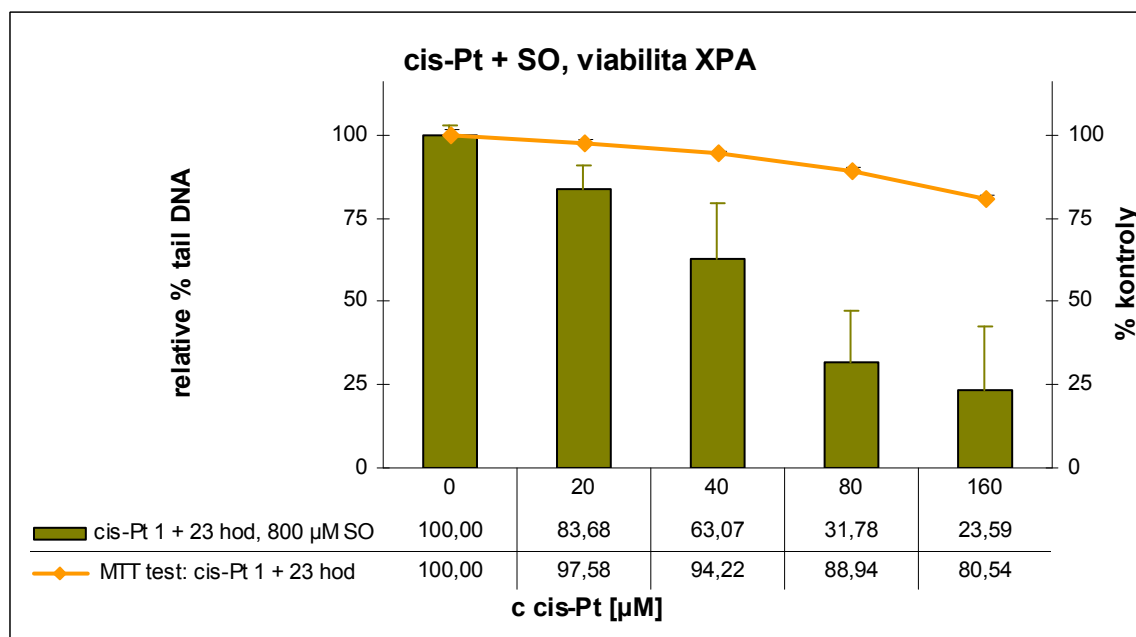
XPA

Výsledky linie XPA shrnuje graf 8. Po jedné hodině inkubace s *cis*-Pt a třech hodinách inkubace s čistým médiem došlo u všech sledovaných koncentrací *cis*-Pt k nárůstu množství křížových vazeb (o 11,52; 16,96; 29,78 a 48,24 %). V intervalu 24 hodin poškození křížovými vazbami ještě vzrostlo (o 2,16; 11,41; 25,91 a 10,76 % vzhledem k hodnotám po čtyřech hodinách).



Graf 8 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

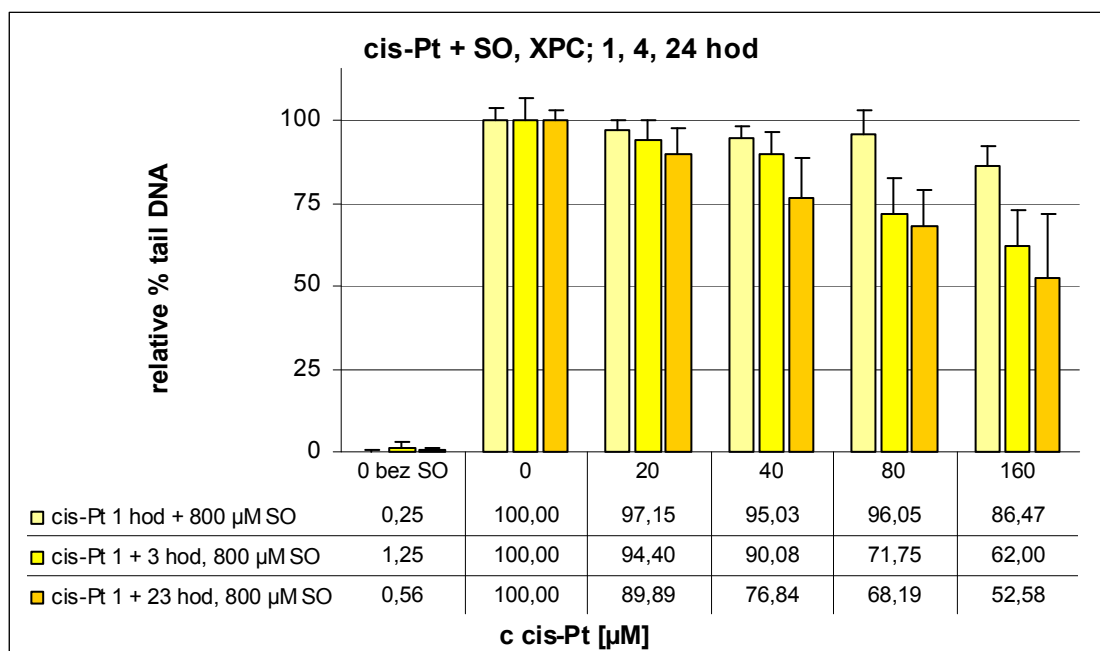
Buněčná viabilita uvedená v grafu 9 je přibližně stejná jako u linie HELF i přes poměrně značnou indukci křížových vazeb. Cytotoxicita *cis*-Pt se výrazněji projevuje při koncentracích 80 a 160 μM *cis*-Pt, při nichž došlo ke snížení viability o 11,06 a 19,47 %.



Graf 9 Viabilita linie XPA a křížové vazby po 24 hodinách

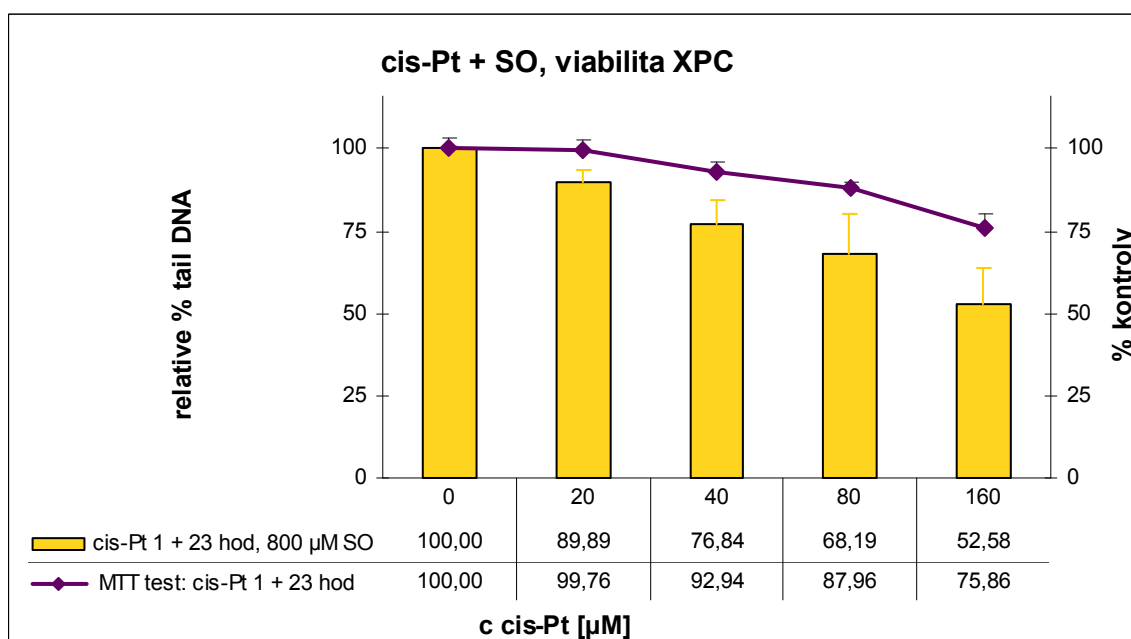
XPC

V intervalu čtyři hodiny byl zjištěn nárůst množství křížových vazeb u všech sledovaných koncentrací *cis*-Pt (o 2,75; 4,95; 24,30 a 24,47 %). Po 24 hodinách byl pozorován menší nárůst tohoto poškození než u buněčné linie XPA (o 4,51; 13,24; 3,56 a 9,42 % vzhledem k hodnotě po čtyřech hodinách). Tyto výsledky jsou uvedeny v grafu 10.



Graf 10 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

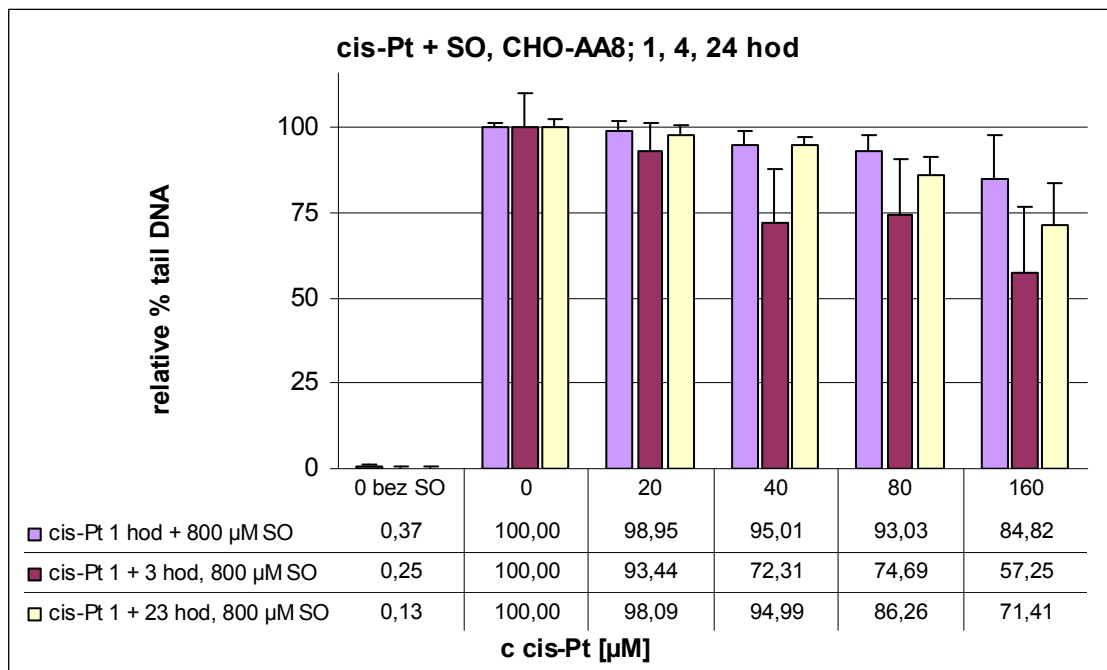
Hodnoty buněčné viability zanesené do grafu 11 přibližně korespondují s hodnotami % tail DNA, přičemž cytotoxické vlastnosti *cis*-Pt životaschopnost buněk významněji ovlivňují při koncentracích 80 a 160 µM (viabilita byla snížena o 12,04 a 24,14 %).



Graf 11 Viabilita linie XPC a křížové vazby po 24 hodinách

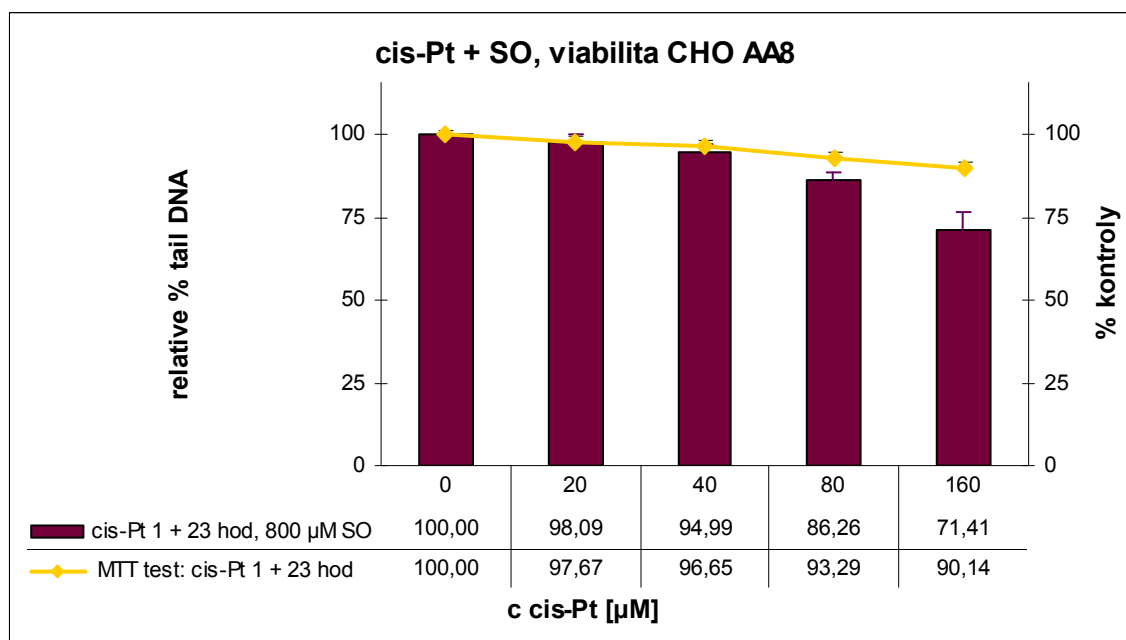
CHO AA8

Graf 12 zobrazuje indukci a reparaci poškození v DNA linie CHO AA8. Po čtyřech hodinách inkubace (jedna s *cis*-Pt a tři s čistým médiem) došlo k nárůstu množství křížových vazeb u všech koncentrací *cis*-Pt (o 5,51; 22,7; 18,34 a 27,57 %). Toto poškození bylo po 24 hodinách částečně opraveno – u dvou nejnižších koncentrací bylo odstraněno úplně, u koncentrace 80 a 160 μM se snížilo o 45,71 a 33,12 %.



Graf 12 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

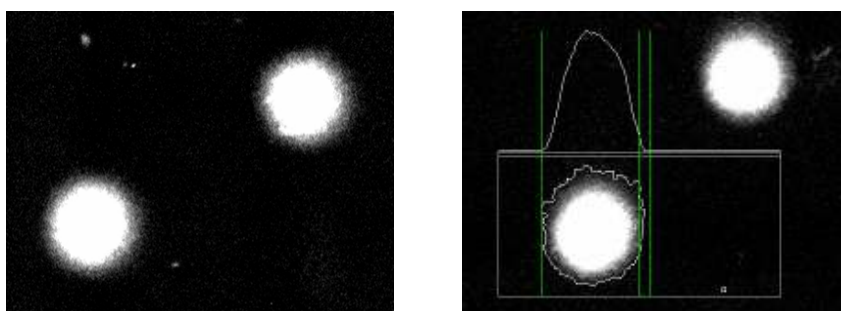
Buněčná viabilita uvedená v grafu 13 v tomto případě koresponduje s relativními hodnotami % tail DNA, výrazněji je ovlivněna při koncentracích 80 a 160 μM , kdy došlo ke snížení viability o 6,71 a 9,86 %.



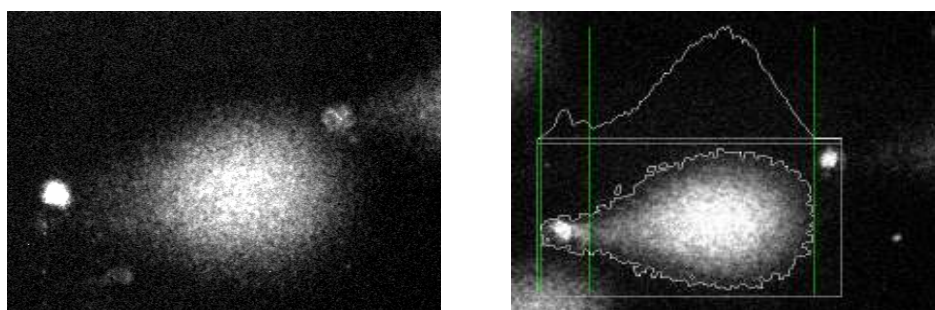
Graf 13 Viabilita linie CHO AA8a křížové vazby po 24 hodinách

Pro ilustraci jsou zde uvedeny fotografie komet z pokusů s buněčnou linií CHO AA8. První fotografie z dvojice zobrazuje buňky tak, jak jsou vidět na obrazovce monitoru před započítáním skórování, na druhé je graficky vyhodnocena fluorescence DNA obarvené ethidium bromidem.

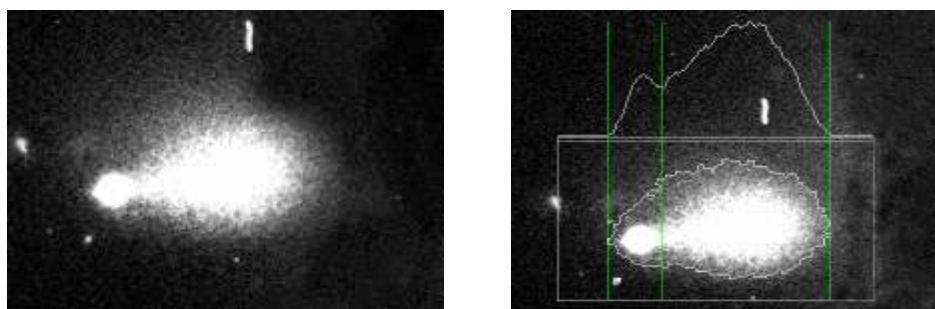
Z fotografií kontrol je patrné, že bez inkubace s SO žádná DNA do ocasu nevycestuje, naopak DNA kontroly ovlivněné pouze SO se nachází z velké většiny v ocasu komety. S přibývajícím koncentrací *cis*-Pt (a tedy s narůstajícím množstvím intra- i inter-řetězcových křížových vazeb) dochází po působení SO k nižší fragmentaci DNA a k její pomalejší migraci při elektroforéze, proto je čím dál větší část DNA lokalizována v hlavě komety.



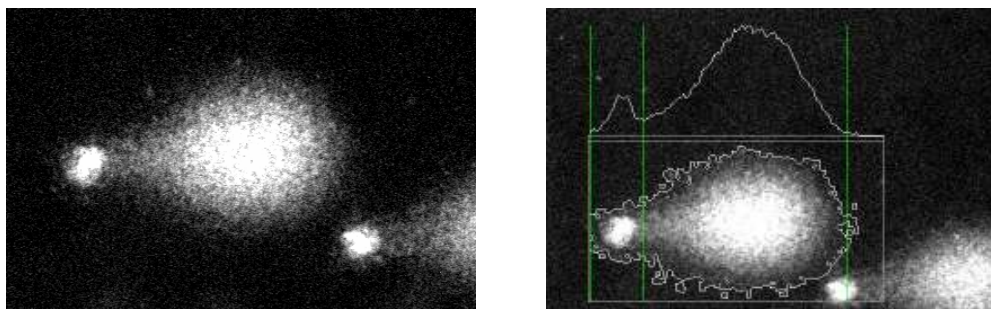
Obr. 1 CHO AA8, 0 μM *cis*-Pt, 0 μM SO; 4 hodiny inkubace, vpravo hodnocení fluorescence



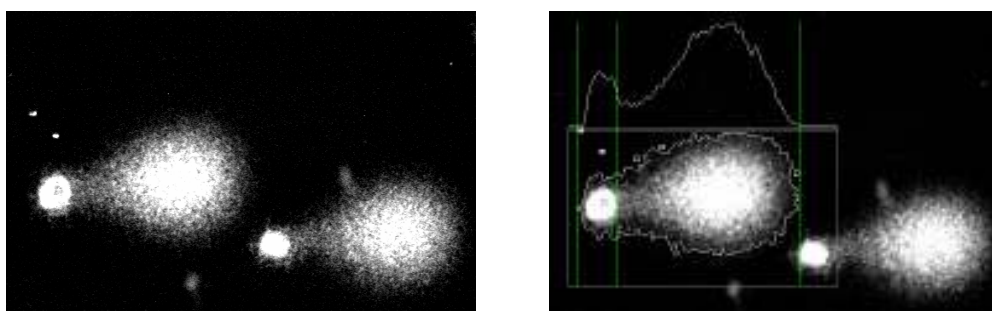
Obr. 2 CHO-AA8 0 μM *cis*-Pt, 800 μM SO; 4 hod inkubace



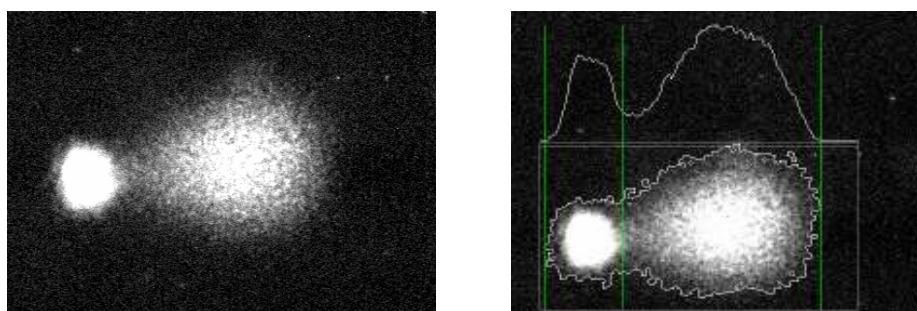
Obr. 3 CHO-AA8 20 μM *cis*-Pt, 800 μM SO; 4 hod inkubace



Obr. 4 CHO-AA8 40 μM cis-Pt, 800 μM SO; 4 hod inkubace



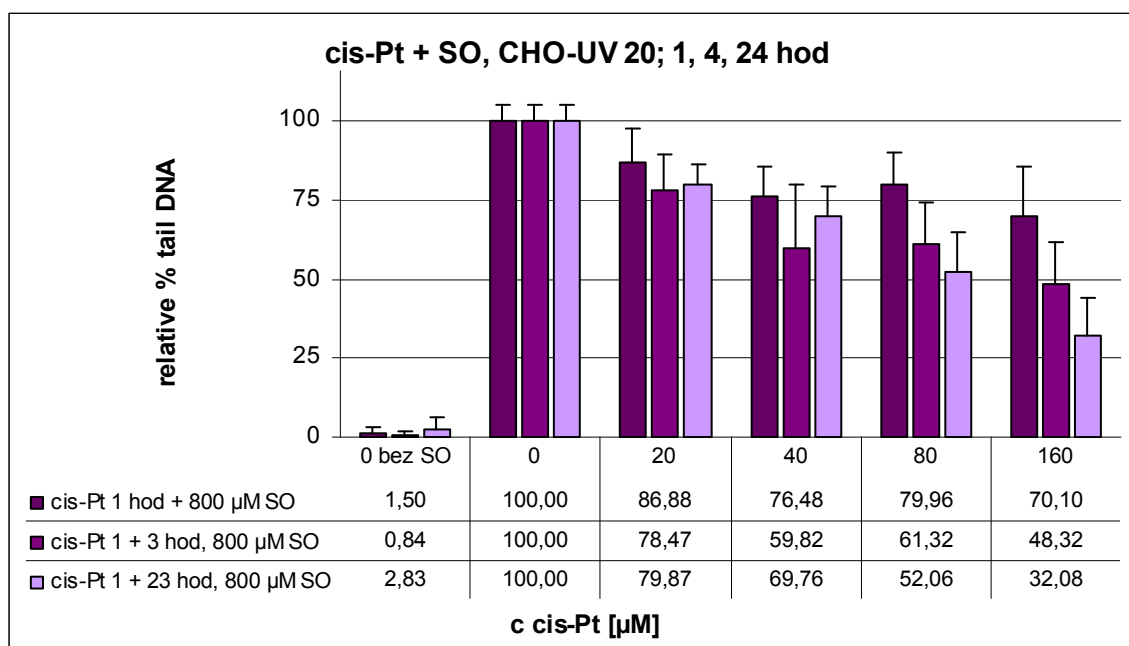
Obr. 5 CHO-AA8 800 μM cis-Pt, 800 μM SO; 4 hod inkubace



Obr. 6 CHO-AA8 160 μM cis-Pt, 800 μM SO; 4 hod inkubace

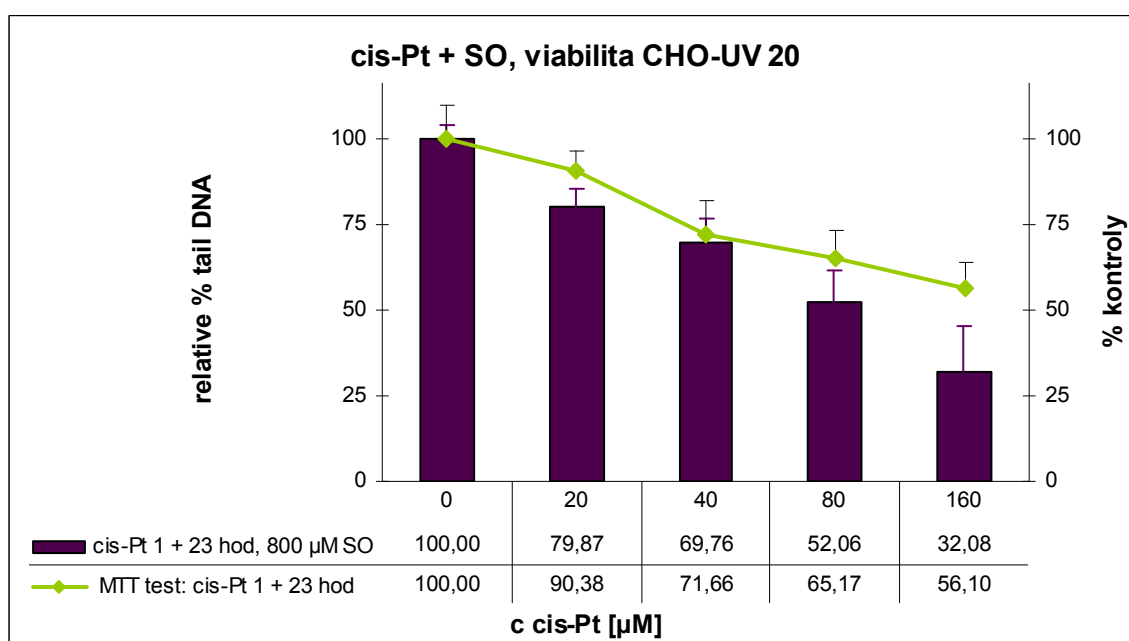
CHO UV-20

V grafu 14 vidíme výsledky indukce a reparace křížových vazeb v DNA buněčné linie CHO UV-20, která je odvozena od linie CHO AA8. V intervalu čtyři hodiny byl pozorován nárůst množství křížových vazeb u všech sledovaných koncentrací cis-Pt (o 8,41; 16,66; 18,64 a 22,02 %). Po 24 hodinách byla zjištěna oprava alkylačního poškození u koncentrací 20 a 40 μM cis-Pt (to bylo sníženo o 6,50 a 24,74 %), u koncentrací 80 a 160 μM došlo k dalšímu nárůstu množství křížových vazeb (o 9,26 a 16,24 % vzhledem k hodnotě po čtyřech hodinách).



Graf 14 Indukce a reparace křížových vazeb vyjádřená vzhledem ke kontrole s SO

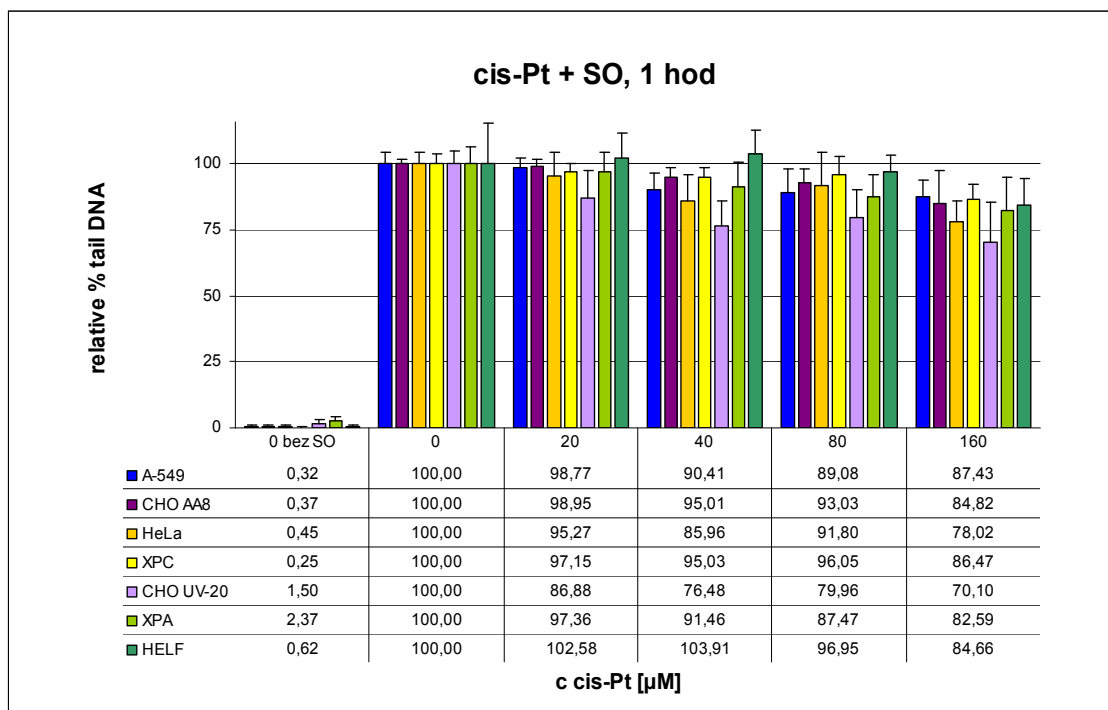
MTT test je spolu s křížovými vazbami po 24 hodinách shrnut v grafu 15. Již při koncentraci 20 µM *cis*-Pt viabilita poklesla o 9,62 %, při koncentraci 40 µM *cis*-Pt bylo přežívání buněk sníženo už o 28,34 %; při koncentracích 80 a 160 µM *cis*-Pt došlo ke snížení viability o 34,83; resp. 43,9 %.



Graf 15 Viabilita linie CHO-UV 20 a křížové vazby po 24 hodinách

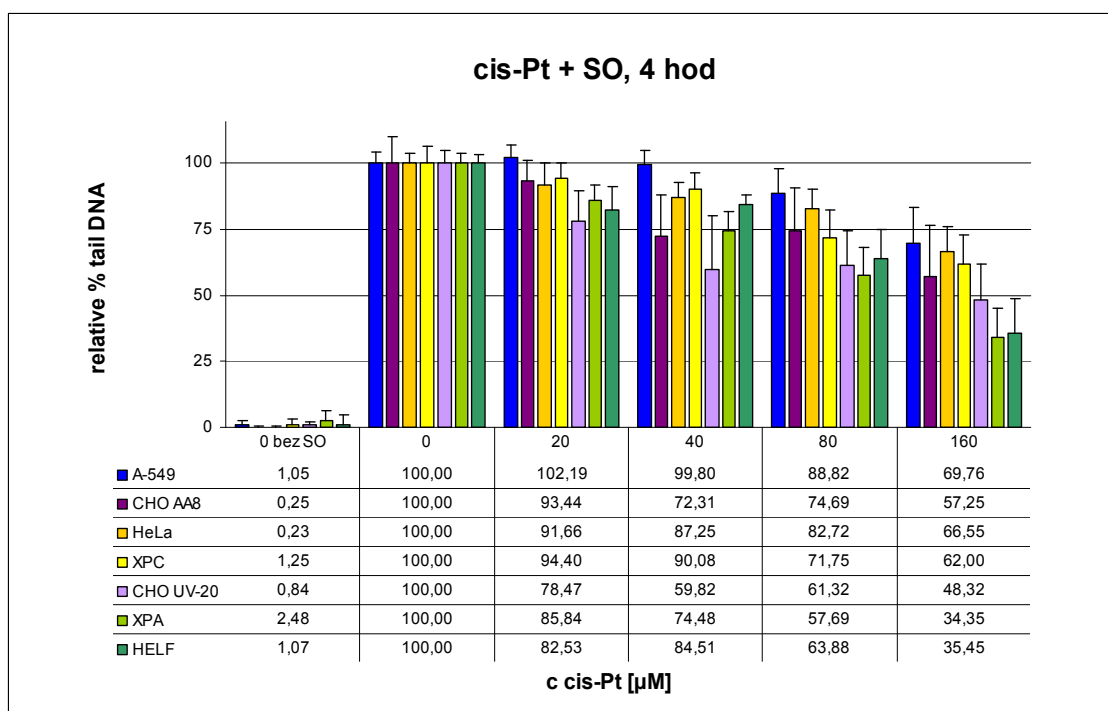
Porovnání indukce a reparace křížových vazeb v DNA různých buněčných linií

Graf 16 shrnuje data získaná z experimentů se všemi použitými buněčnými liniemi. Největší indukce křížových vazeb při koncentraci 160 μM po jedné hodině inkubace byla zaznamenána u buněčných linií HeLa a CHO UV-20, nejmenší u A-549 a XPC.



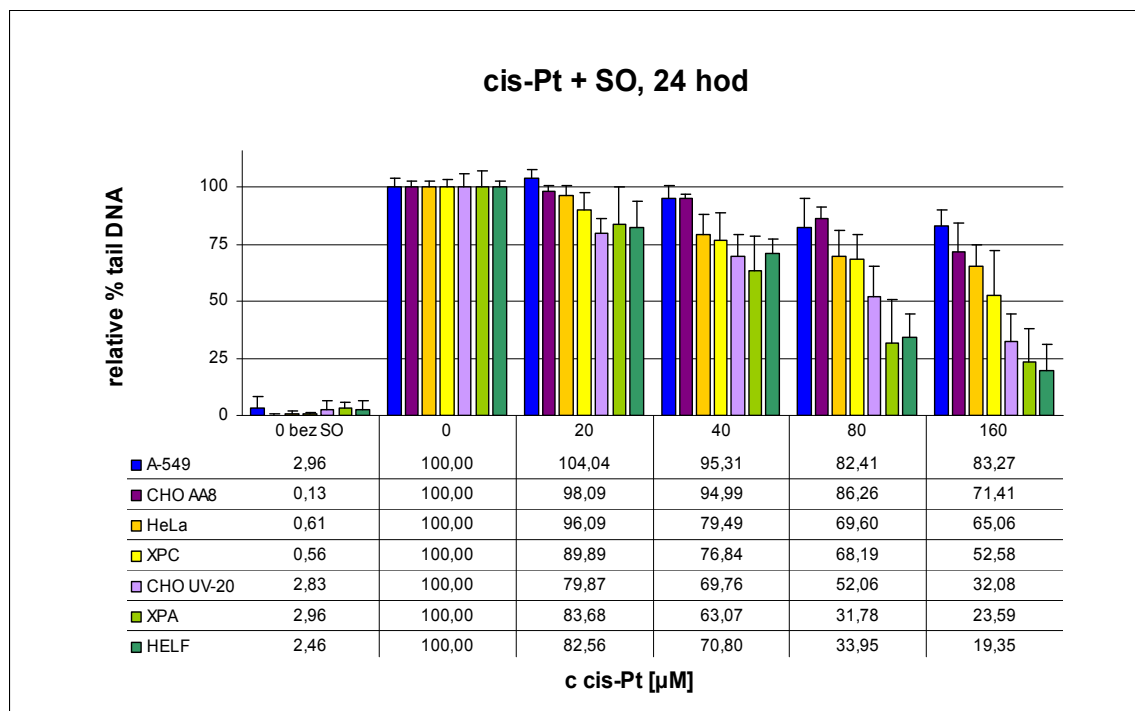
Graf 16 Indukce křížových vazeb po jedné hodině inkubace u všech zkoumaných linií

V intervalu čtyři hodiny byl pozorován nárůst množství křížových vazeb u všech buněčných linií i koncentrací *cis*-Pt (nejvyšší u linií HELF a XPA, nejnižší u A-549 a HeLa), jak je uvedeno v grafu 17.



Graf 17 Indukce (1 hod) a reparace křížových vazeb v intervalu 4 hodiny u všech zkoumaných linií

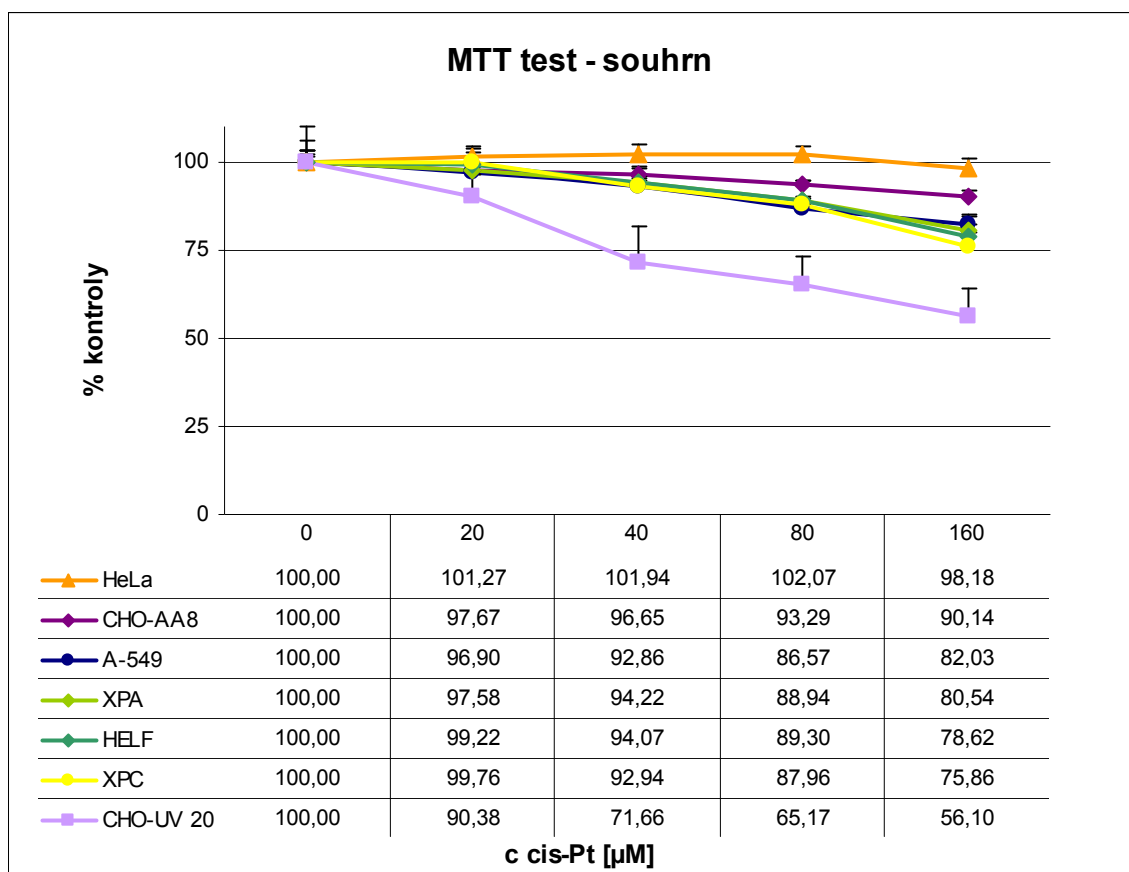
Reparaci indukovaných křížových vazeb po 24 hodinách můžeme sledovat v grafu 18. U linií A-549 a CHO AA8 bylo poškození částečně opraveno, u HeLa buněk zůstalo přibližně na stejné úrovni, u zbývajících linií poškození naopak vzrostlo.



Graf 18 Indukce (1 hod) a reparace křížových vazeb v intervalu 24 hodin u všech zkoumaných linií

4.3. Porovnání viability různých buněčných linií po působení *cis*-Pt

Graf 19 srovnává životaschopnost všech zkoumaných buněčných linií. Z výsledku experimentu vyplývá, že nejcitlivější je buněčná linie CHO UV-20 s deficitem v opravě DNA (pokles viability o 43,9 %), ostatní deficitní linie (XPA, XPC) spolu s liniemi HELF a A-549 vykazují menší citlivost (pokles viability o 17,97-24,14 %), o něco méně citlivá je buněčná linie CHO AA8 (pokles o 9,86 %). Nejmenší citlivost k cytotoxickým účinkům *cis*-Pt má linie HeLa (pokles viability pouze o 1,82 %).



Graf 4 Viabilita zkoumaných buněčných linií po ovlivnění *cis*-Pt(1 hod) a reparaci poškození (23 hod)

5. DISKUSE

5.1. Poškození DNA zlomy

Při experimentech jsme vycházeli z protikladných vlastností *cis*-Pt (křížové vazby) a SO (zlomy). Pro monitorování vzniku křížových vazeb bylo tedy nejprve třeba provést pokusy s buňkami ovlivněnými *cis*-Pt a SO a pouze SO.

Z výsledků vyplývá, že se zvyšující se koncentrací SO dochází k vyšší fragmentaci DNA nepoškozené křížovými vazbami způsobenými vazbou *cis*-Pt na DNA a tím k jejich odhalení – čím více křížových vazeb, tím menší je po působení SO % tail DNA. K dalším pokusům byla proto zvolena koncentrace 800 μ M SO, která vyvolá dostatečně vysoký počet zlomů v DNA (u kontroly neovlivněné *cis*-Pt dosahuje procento DNA v ohonu 88 %).

Další autoři zabývající se účinky SO na různé buněčné linie docházejí k velmi podobným výsledkům. Závislost poškození DNA na koncentraci SO je ve sledovaném rozmezí lineární, jeho následná reparace probíhá poměrně rychle.^{67, 68, 69}

5.2. Poškození DNA křížovými vazbami a jejich reparace

U všech buněčných linií byl po celkem čtyřech hodinách inkubace (jedna hodina působení *cis*-Pt a tři hodiny reparace) zaznamenán nárůst množství křížových vazeb vzhledem k hodnotám po jedné hodině. To je způsobeno pomalejší reakcí, kterou se tvoří druhá vazba křížové vazby.⁷⁰

Oprava alkylačního poškození po dvaceti třech hodinách byla pozorována u linií CHO AA8 (a to u všech koncentrací), A-549 (u koncentrací 20 a 160 μ M, při ostatních koncentracích bylo poškození zvýšeno), HeLa a CHO UV-20. U dvou posledně jmenovaných linií oprava nastala pouze u nejnižších koncentrací *cis*-Pt (20 μ M u linie HeLa, 20 a 40 μ M u CHO UV-20), při vyšších koncentracích poškození křížovými vazbami ještě vzrostlo.

U linií HELF, XPA a XPC byl zjištěn při všech koncentracích *cis*-Pt další nárůst množství křížových vazeb, což u linií XPA a XPC (a také CHO UV-20) zřejmě souvisí s defektní opravou DNA.

Dále uvádíme dílčí výsledky prací dalších autorů, kteří se zabývali *cis*-Pt a ke svým výzkumům využívali stejné buněčné linie, které byly použity i v našich experimentech.

Po ovlivnění buněk A-549 150 μ M *cis*-Pt trvajícím jednu hodinu zjistil tým V. J. Spanswické⁷¹ 25% pokles v tail moment, po třech hodinách reparace byl tento pokles 45 %, po 24 hodinách 26 % a konečně po 48 hodinách 14 % - zde bylo poškození opraveno z 81 %.

V práci S. Piaggi a jejích spolupracovníků⁷² byly buňky linie HeLa jednu hodinu ovlivňovány 20 μ M *cis*-Pt – tail DNA byl snížen o 10 %. Po reparaci trvající tři hodiny byl tail DNA snížen o 25 %, po 24 hodinách byl snížen asi o 8 %. To zhruba odpovídá našim výsledkům při stejné koncentraci.

Pro zhodnocení reparace křížových vazeb způsobených v linii XPA/XPC *cis*-Pt zvolili M. Enoiu, J. Jiříčný a O. D. Schärer⁷³ metodu založenou na reaktivaci genové exprese, která je závislá na NER. Genová exprese byla zablokována pomocí plasmidu nesoucího specifické poškození *cis*-Pt v aktivně transkribovaném místě. Relativní oprava byla určena jako procenta aktivity genu v porovnání s nepoškozeným plasmidem, jehož aktivita byla brána za 100 %. U linie XPA se oprava křížových vazeb pohybovala kolem 20 % (u fibroblastů s nepoškozeným genem oprava dosáhla 60 %), což naznačuje, že odstranění poškození je závislé na funkční NER.

U linie XPC i linie XPC(+) s funkčním genem se oprava alkylací pohybovala shodně kolem 40 %. XPC protein tedy zřejmě v této cestě opravy poškození nehraje tak významnou roli. Z výsledků této práce obecně vyplývá, že oprava interřetězcových křížových vazeb postupuje cestou TC-NER (transcription-coupled NER; NER spojenou s transkripcí).

Při porovnání linií CHO AA8 a CHO UV-20 dospěli R. E. Meyn, S. F. Jenkins a L. H. Thompson⁷⁰ k těmto výsledkům: Linie CHO AA8 odstranila téměř 80% poškození, zatímco linie UV-20 pouze 24 % (výzkum prováděli metodou alkalické eluce, roztok *cis*-Pt o koncentraci 5 µg/ml buňky ovlivňoval jednu hodinu, následovala reparace po tři a dvacet tři hodin).

Jiný trend opravy křížových vazeb pozorovali I. U. de Silva a její spolupracovníci⁷⁴ - poškození bylo indukováno jednu hodinu 50 µM *cis*-Pt, po 24 hodinách reparace byly křížové vazby eliminovány u CHO AA8 o 55 %, u ERCC1 deficitních buněk o 50 %. V našem případě se ovšem u dvou nejvyšších koncentrací *cis*-Pt množství křížových vazeb v DNA CHO UV-20 ještě zvýšilo.

5.3. Viabilita buněčných linií po ovlivnění *cis*-platinou a reparaci poškození

Z výsledků, i přes rozdílnou citlivost zkoumaných buněčných linií, vyplývá, že se zvyšující se koncentrací *cis*-Pt se viabilita snižuje. Ta je výrazněji ovlivněna (pokles o více než 10 %) při koncentraci 80 µM a vyšší.

Zdaleka největší citlivost k toxickým účinkům *cis*-Pt prokázala linie CHO UV-20, kde k tomuto poklesu došlo již při koncentraci 20 µM. Při koncentraci 160 µM byla viabilita této linie snížena nejvíce – o 44 %. Z toho je patrné, že cytotoxické vlastnosti *cis*-Pt jsou u této buněčné linie vystupňovány defektní opravou DNA – produkt genu *ERCC1* (specifická endonukleasa) hraje zásadní roli při NER.

Naopak linie HeLa je nejméně citlivá, viabilita byla snížena až při nejvyšší koncentraci o pouhých 2 %. To by mohlo naznačovat, že u této linie je poškozena některá ze signálních cest vedoucí k apoptóze nebo systém kontrolních bodů buněčného cyklu.

U linií, které jsme zkoumali, se nepotvrdilo, že by se viabilita vždy snižovala úměrně se zvyšujícím se množstvím křížových vazeb, ani že životaschopnost linií deficitních v dalších proteinech potřebných k NER (XPA a XPC) je ovlivněna výrazněji než linií s normální opravou DNA (ta byla srovnatelná s liniemi A-549 a HELF).

Dále jsou uvedeny výsledky některých dalších autorů, kteří se také zabývali vlivem *cis*-Pt na buněčnou viabilitu linií, které jsme zvolili pro naše experimenty.

Viabilita linie A-549 rezistentní k působení *cis*-Pt⁷⁵ byla při experimentech P. Zhanga a jeho spolupracovníků⁷⁵ po 48 hodinách inkubace s 16-96 μ M *cis*-Pt snížena o 25-77,5 % při buněčné denzitě $2 \cdot 10^4$, při buněčné denzitě $4 \cdot 10^4$ o 13,6-74,5 % (IC₅₀ je odhadována na 64-70 μ M *cis*-Pt). H-O Jin se svým kolektivem⁷⁶ při ovlivnění A-549 10 μ M *cis*-Pt po 24 hodin zjistil pokles viability zhruba o 10 %.

Při pokusech M. Ahmeda a K. Jamily⁷⁷ prokázala linie HeLa ovlivňovaná 24 hodin 1-50 μ M *cis*-Pt na dávce závislou inhibici růstu. Hodnota LC-50 zjištěná při tomto pokusu byla 13 μ M *cis*-Pt. Viabilita při koncentraci 40 μ M *cis*-Pt byla snížena o 90 %.

Při experimentu, který prováděla S. Piaggi se svými spolupracovníky⁷², působila *cis*-Pt (10-100 μ M) na HeLa buňky po dobu jedné hodiny, poté byly buňky inkubovány po 24 hodin v čistém médiu. Viabilita buněk vysazených z buněčné suspenze o koncentraci $4 \cdot 10^3$ buněk/cm² a $40 \cdot 10^3$ buněk/cm² byla při nejvyšší koncentraci *cis*-Pt snížena zhruba o 90 % (u $4 \cdot 10^3$ buněk/cm² o něco více). Přežívání buněk se nejvíce lišilo u koncentrace 20 μ M: u $4 \cdot 10^3$ buněk/cm² se snížilo přibližně o 80 %, zatímco u $40 \cdot 10^3$ buněk/cm² pouze o 25 %. To je vysvětlováno na buněčné hustotě závislou nadměrnou expresí glutathiontransferasy omega 1-1 (GSTO1-1), která zřejmě hraje roli v rezistenci vůči *cis*-Pt.

Poměr sensitivity XPA a XPC buněk k *cis*-Pt zjištěný MTT testem je dle C. Roccy a jejích spolupracovníků⁷⁸ u linie XPA (XP12RO-SV) 6, u linie XPC (XP4PA) 2,5. Relativní sensitivity byla vypočítána jako poměr hodnot IC₅₀ divokého typu a deficitních linií, přičemž hodnota 1 značí nezměněnou citlivost, zatímco hodnoty větší než 1 ukazují citlivost zvýšenou.

M. Enoiu, J. Jiříčný a O. D. Schärer⁷³ zkoumali ve svých pokusech snížení viability linií XPA a XPC pomocí klonogenického testu. (Buňky byly po 8 hodinách od nasazení na misky ovlivněny 0,1-0,4 μ g/ml *cis*-Pt po dobu 24 hodin, po 9-16 dnech byly kolonie fixovány a obarveny 0,5% krystalovou violetí v 20% ethanolu. Počítány byly kolonie tvořené více než třiceti buňkami. Za 100% přežití byl stanoven počet kolonií získaný z neovlivněné kontroly.) Při koncentraci 0,4 μ g/ml *cis*-Pt byl u linie XPA zaznamenán 100% pokles životaschopnosti (při 0,2 μ g/ml *cis*-Pt přežilo 18 % kolonií), u XPC 60%.

K hodnocení sensitivity buněčných linií CHO AA8 a CHO UV-20 k *cis*-Pt byl při výzkumu I. De Silvy a jejího týmu⁷⁴ použit SRB test, buňky byly vystaveny vzrůstající koncentraci *cis*-Pt po dobu jedné hodiny, inkubovány tři dny v čistém médiu a poté obarveny SRB (sulforhodaminem B). Frakce kontroly A540 byla u CHO AA8 při koncentraci 80 μ M *cis*-Pt 0,3; u ERCC1 deficitních buněk při koncentraci 5 μ M *cis*-Pt byla téměř nulová. (Frakce kontroly A540 byla vypočítána podle následující rovnice: frakce kontroly A540 = optická denzita ovlivněných jamek/optická denzita neovlivněné kontroly. Nakonec byla vypočtena průměrná frakce kontroly A540 pro každou koncentraci *cis*-Pt se standardními odchylkami.⁷⁹)

Při porovnání IC_{50} je deficitní linie k *cis*-Pt 37x citlivější než mateřská linie AA8, což naznačuje stěžejní roli této strukturně specifické nukleasy při opravě poškození vyvolaného *cis*-Pt. Naproti tomu linie XPB (UV-23), XPD (UV-42) a XPG (UV-135) jsou k *cis*-Pt pouze 1,4x; 1,3x a 3,1x citlivější než mateřská linie. Tyto proteiny účastnící se NER zřejmě hrají při opravě poškození mnohem menší roli.⁷⁴

6. ZÁVĚR

Experimenty využívající kometového testu byly prováděny za účelem sledování genotoxických účinků *cis*-Pt na různé buněčné linie se zaměřením na indukci křížových vazeb a jejich reparaci buněčnými mechanismy.

Nárůst množství křížových vazeb byl nejvyšší u linií s defektní opravou DNA (v našem případě to byly linie XPA, XPC a CHO UV-20), u linie HELF byl tento nárůst ještě vyšší. Oprava DNA byla pozorována u linií A-549 a CHO AA8, u linie HeLa poškození zůstalo přibližně na stejné úrovni.

Dále byla sledována viabilita buněčných linií po ovlivnění *cis*-Pt. I zde byl na základě snížení viability potvrzen předpoklad, že ke genotoxickým vlastnostem *cis*-Pt jsou citlivější linie deficitní v některém genu účastnícím se opravy poškození DNA – čím významnější roli při reparaci gen hraje, tím je linie citlivější. Naopak linie HeLa se zdá být vůči krátkodobému působení *cis*-Pt dosti odolná.

SEZNAM ZKRATEK

A = adenin

α -MEM = α -Modified Eagle's Essential Medium; α -modifikace Eagleova základního média

AP = apurinové/apyrimidinové místo

atb = antibiotika

ATP = adenosintrifosfát

BER = base excision repair; básová excisní reparace

C = cytosin

cis-Pt = *cis*-platina, *cis*-diammin-dichloroplatnatý komplex

CTR1 = copper transporter 1; přenašeč mědi typ 1

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Dulbeccova modifikace Eagleova média)

DMSO = dimethylsulfoxid

DNA = deoxyribonucleic acid; kyselina deoxyribonukleová

DNA-PK = DNA-dependentní proteinkinasa

dRpasa = DNA-deoxyribofosfodiesterasa

EDTA = ethylendiammintetraoctová kyselina

FBS = Fetal Bovine Serum; fetální bovinní sérum

FDA = Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)

G = guanin

GSH = glutathion

HELFL cells = Human Embryonic Lung Fibroblast; lidské embryonální plicní fibroblasty

HMP = high melting point; s vysokým bodem tání

Hsp90 = heat shock protein 90; protein tepelného šoku 90

HT = hydroxytryptamin, serotonin

LMP = low melting point; s nízkým bodem tání

MMR = mismatch repair; oprava chybného párování bází

MTT = 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-difenyltetrazolium bromid

NER = nucleotide excision repair; nukleotidová excisní reparace

NHEJ = nonhomologous end joining; nehomologní spojení konců

PBS = Phosphate buffered saline; fosfátem pufovaný fyziologický roztok

RNA = ribonucleic acid; kyselina ribonukleová

SCGE = single cell gel electrophoresis; jednobuňková elektroforéza

SDS = lauroylsírán sodný

SO = styrenoxid

T = thymin

ZDROJE

- 1 WARD, John F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1988, roč. 35, s. 95-125, ISBN 978-0-12-540035-0.
- 2 LÖBER, Günter – KITTLER, Leonhard. Selected topics in photochemistry of nucleic acids: recent results and perspectives. *Photochemistry and Photobiology*, únor 1977, roč. 25, č. 2, s. 215-233, ISSN 1751-1097.
- 3 SINGER, Beatrice – GRUNBERGER, Dezider. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*. 1. vyd. New York: Plenum Press, 1983. 347 s. ISBN 0306414309.
- 4 HEARST, John. E. et al. The reaction of the psoralens with deoxyribonucleic acid. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1984, roč. 17, č. 1, s. 1-44, ISSN 0033-5835.
- 5 FRIEDBERG, Errol C. et al. *DNA Repair and Mutagenesis*. 2. vyd. Washington: ASM Press, 2006, s. 26-46. ISBN 1-55581-319-4.
- 6 ANDERS, Marion Walter – DEKANT, Wolfgang. Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds. *Advances in Pharmacology*, květen 1994, roč. 27, 519 s., ISSN 0065-3144.
- 7 ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [citováno 20. dubna 2012]. <<http://www.stefajir.cz>>.
- 8 LINDAHL, Tomas. New class of enzymes acting on damaged DNA. *Nature*, leden 1976, sv. 256, s. 64-66, ISSN 0028-0836.
- 9 EFFERTH, Thomas – VOLM, Manfred. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, srpen 2005, roč. 107, č. 2, s. 155-176, ISSN 0163-7258
- 10 ROBERT, Jacques et al. Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, červen 2005, roč. 54, č. 3, s. 171-196, ISSN 1040-8428
- 11 ALBERTS, Bruce et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložili Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. 2. vyd. Brno: Espero Publishing, 2005. s.200. ISBN 80-902906-2-0.
- 12 TODO, Takeshi. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutation Research*, červen 1999, sv. 434, č. 2, s. 89-97, ISSN 0027-5107.
- 13 BOGDEN, James M. – EASTMAN, Alan – BRESNIK, Edward. A system in mouse liver for the repair of O6-methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acid Research*, květen 1981, roč. 9, č. 13, s. 3089-3103, ISSN 0305-1048.
- 14 ZAK, Petr – KLEIBL, Karol – LAVAL, Françoise. Repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine by the human and rat O6-methylguanine-DNA-methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, leden 1994, sv. 269, č. 1, s. 730-733, ISSN 0021-9258.
- 15 AAS, Per Arne et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, únor 2003, sv. 421, s. 859-863, ISSN 0028-0836.
- 16 JACOBS, Anita – BOPP, Annemarie – HAGEN, Ulrich. In vitro repair of single-strand breaks in irradiated DNA by polynucleotide ligase. *International Journal of Radiation Biology*, 1972, roč. 22, č. 5, s. 431-435, ISSN 0955-3002.

-
- 17 CHRISTMANN, Marcus et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxikology*, listopad 2003, roč. 193, č. 1-2, s. 3-34, ISSN 0300-483X.
- 18 PÂQUES, Frédéric – HABER, James E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, červen 1999, roč. 63, č. 2, s. 349-404, ISSN 1092-2172.
- 19 KAUFFMAN, George B. et al. Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Review*, říjen 2010, roč. 54, č. 4, s. 250-256, ISSN 0032-1400.
- 20 Nobelprize.org. *Alfred Werner - Biography* [online]. [citováno 31. ledna 2012]. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1913/werner-bio.html>
- 21 PETSKO, Gregory A. A Christmas Carol. *Genome Biology* [online]. 28. prosinec 2001, roč. 3, č. 1, ISSN 1465-6914. [citováno 2. února 2012]. <<http://genomebiology.com/2001/3/1/comment/1001>>
- 22 HIGBY, Donald J. et al. Diaminodichloroplatinum: A phase I study showing responses in testicular and other tumors. *Cancer*, květen 1974, sv. 33, č. 5, s. 1219-1225, ISSN 1097-0142.
- 23 HAMBLEY, Trevor W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. *Dalton Transactions*, říjen 2007, sv. 9, č. 43, s. 4929-4937, ISSN 1364-5447.
- 24 Online Database of Chemicals from Around the World. *Cisplatin* [online]. [citováno 5. února 2012]. <<http://www.chemblink.com/products/15663-27-1.htm>>.
- 25 Český lékopis 2009 = *Pharmacopoeia bohémica MMIX* 2. díl. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, s. 70, 1723, ISBN 978-80-247-2994-7.
- 26 HARTL, Jiří et al. Chemoterapeutika nádorového bujení. In *Farmaceutická chemie IV*. 1. dotisk 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008. Kapitola 1.6.2.3, s. 147, ISBN 978-80-246-1169-3.
- 27 Souhrn údajů o přípravku Platidium 10, Platidium 25, Platidium 50 [online]. Datum revize textu 27. 9. 2011 [citováno 10. února 2012]. <<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC23149.pdf>>.
- 28 Souhrn údajů o přípravku Cisplatin Hospira [online]. Datum revize textu 18. 1. 2012 [citováno 15. února 2012]. <<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC26905.pdf>>.
- 29 FISHER, Stephanie J. et al. Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. *NeuroToxicology*, květen 2008, roč. 29, č. 3, s. 444-452, ISSN 0161-813X.
- 30 Souhrn údajů o přípravku Cisplatin „Ebewe“ [online]. Datum revize textu 13. 3. 2008 [citováno 15. února 2012]. <<http://www.sukl.cz/download/spc/SPC81697.doc>>.
- 31 AKABOSHI, Mitsuhiko et al. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1992, roč. 83, s. 522 et 1994, roč. 85, s. 106. ISSN 0910-5050 via CEPEDA, Victoria et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, leden 2007, roč. 7, č. 1, s. 3-18, ISSN 1875-5992.
- 32 SIDDIK, Zahid H. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs. In *The Cancer Handbook*. Alison, Malcolm R. Wiley, Publikováno online 15. I. 2005, ISBN 9780470025079.

-
- 33 CEPEDA, Victoria et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, leden 2007, roč. 7, č. 1, s. 3-18, ISSN 1875-5992.
- 34 DOHANUE, Brian A. et al. Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry*, červen 1990, roč. 29, č. 24, s. 5872-5880, ISSN 0006-2960.
- 35 CHANEY, Stephen G. – VAISMAN, Alexandra. Specificity of platinum-DNA adduct repair. *Journal of Inorganic Biochemistry*, říjen 1999, roč. 77, č. 1-2, s. 71-81, ISSN 0162-0134.
- 36 TURCHI, John J. – HENKELS, Karen M. Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, červen 1996, sv. 271, č. 23, s. 13861-67, ISSN 0021-9258.
- 37 BELLON, Steven F. – COLEMAN, Julia H. – LIPPARD, Stephen J. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*, srpen 1991, roč. 30, č. 32, s. 8026-8035, ISSN 0006-2960.
- 38 MALINGE, Jean-Marc – GIRAUD-PANIS, Marie-Josèphe – LENG, Marc. Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, říjen 1999, roč. 77, č. 1-2, s. 23-29, ISSN 0162-0134.
- 39 SUCHOPÁR, Josef et al. *Remedia: Compendium*. 4. vyd., Praha: Panax, 2009. s. 585, ISBN 978-80-902806-4-9
- 40 ARNESANO, Fabio – NATILE, Giovanni. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews*, říjen 2009, sv. 253, č. 15-16, s. 2070 – 2081, ISSN 0010-8545.
- 41 SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, březn 1988, sv. 175, č. 1, s. 184-191, ISSN 0014-4827.
- 42 GICHNER, Tomáš – MUKHERJEE, Anita – VELEMÍNSKÝ, Jiří. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. *Mutation Research*, červen 2006, sv. 605, č. 1-2, s. 17-21, ISSN 1383-5718.
- 43 COLLINS, Andrew R. et al. Comet Assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, červen 1997, roč. 30, č. 2, s. 139-146, ISSN 0893-6692.
- 44 SIMON, Luke et al. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Human Reproduction*, květen 2010, roč. 25, č. 7, s. 1594-1608, ISSN 0268-1161.
- 45 SANTOS, Susy J. - SINGH, Narendra P. - NATARAJAN, Adayapalam T. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental Cell Research*, květen 1997, sv. 232, č. 2, s. 407-411, ISSN 0014-4827.
- 46 FISHER, A. E – BURKE, Dermot – ROUTLEDGE, Michael N. Can irradiation of rectal tumour cells from patient biopsy predict outcome of radiotherapy? *Proceedings of the Genome Stability network/United Kingdom Environmental Mutagen Society Joint Congress*, University of Cardiff, 1-4 July 2007.

-
- 47 SMITH, Andrew J. O. et al. Comet assay measures of irinotecan-induced DNA damage in vitro and in vivo. *Proceedings of the Genome Stability network/United Kingdom Environmental Mutagen Society Joint Congress*, University of Cardiff, 1 – 4 July 2007.
- 48 DIXON, David R. et al. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, červenec 2002, roč. 17, č. 6, s. 495-507, ISSN 0267-8357.
- 49 COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, duben 2004, roč. 26, č. 3, s.249-261, ISSN 1073-6085.
- 50 TICE, Raymond R. et al. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, červen 2000, roč. 35, č. 3, s. 206-221, ISSN 0893-6692.
- 51 COOK, Peter R. – BRAZELL, Iris A. – JOST, Erich. Characterization of nuclear structures containig superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, listopad 1976, roč. 22, č. 2, s. 303-324, ISSN 0021-9533.
- 52 OSTLING, O. – JOHANSON, Karl J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, říjen 1984, roč. 123, č. 1, s. 291-298, ISSN 0006-291X.
- 53 MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological methods*, prosinec 1983, roč. 65, č. 1-2, s. 55-63, ISSN 0022-1759.
- 54 DENIZOT, François – LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological methods*, květen 1986, roč. 89, č. 2, s. 271-277, ISSN 0022-1759.
- 55 DVOŘÁK, Zdeněk. *Hodnocení cytotoxicity in vitro na modelu lidské buněčné linie HepG2* [online]. [citováno 5. 8. 2012]. <<http://genetika.upol.cz/index.php?page=predmet&zkratka=49>>
- 56 A-549 [online]. [citováno 4. května 2012]. <<http://a549.com/>>.
- 57 MASTERS, John R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, duben 2002, roč. 2, č. 4, s. 315-319, ISSN 1474-175X.
- 58 LGC Standards [online]. [citováno 12. července 2012].< <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-2&Template=cellBiology> >.
- 59 SKLOOT, Rebecca. Henrietta's Dance. *Johns Hopkins Magazine*, duben 2000, roč. 52, č. 2, ISSN 0021-7255. Dostupné z: <http://www.jhu.edu/jhumag/0400web/01.html>.
- 60 HAYFLICK, Leonard – MOORHEAD, Paul. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, prosinec 1961, roč. 25, č. 3, s. 585-621, ISSN 0014-4827.
- 61 YUAN Li et al. mot-2-Mediated Cross Talk between Nuclear Factor- κ B and p53 Is Involved in Arsenite-Induced Tumorigenesis of Human Embryo Lung Fibroblast Cells. *Environmental Health Perspectives*, červenec 2010, roč. 118, č. 7, s. 936-942, ISSN 0091-6765.

-
- 62 Health Protection Agency Culture Collections [online]. [citováno 2. února 2013].
<http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85050302&collection=ecacc_gc>.
- 63 BRAMSON, Jonathan – PANASCI, Lawrence C. Effect of ERCC-1 Overexpression on Sensitivity of Chinese Hamster Ovary Cells to DNA Damaging Agents. *Cancer Research*, červenec 1993, roč. 53, č. 14, s. 3237-3240, ISSN 0008-5472.
- 64 GenScript [online]. [citováno 24. února 2013].
<http://www.genscript.com/cgi-bin/protein/protein.pl?id=ERCC1_HUMAN>.
- 65 ICHIKAWA, Minoru et al. Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. *Mutation Research/DNA Repair*, květen 2000, sv. 459, č. 4, s. 285-298, ISSN 1568-7864.
- 66 LEHMANN Alan R. – MCGIBBON David – STEFANINI Miria. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, listopad 2011, roč. 6, č. 1, č. čl. 70, ISSN 1750-1172.
- 67 KÖHLEROVÁ, Renata – ŠTĚTINA, Rudolf. The repair of DNA damage induced in human peripheral lymphocytes with styrene oxide. *Acta medica Supplementum*, 2003, roč. 46, č. 3, s. 95-100, ISSN 1211-247X.
- 68 GODDERIS, Lode et al. Dose –dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation. *Toxicology*, únor 2006, roč. 219, č. 1-3, s. 220-229, ISSN 0300-483X
- 69 VAGHEF, Hamid – HELLMAN, Bjorn. Detection of Styrene and Styrene Oxide-Induced DNA Damage in Various Organs of Mice Using the Comet Assay. *Pharmacology & Toxicology*, srpen 1998, roč. 83, č. 2, s. 69-74, ISSN 0901-9928.
- 70 MEYN, Raymond E. – JENKINS, Susan F. – THOMPSON, Larry H. Defective Removal of DNA Cross-Links in a Repair-deficient Mutant of Chinese Hamster Cells. *Cancer Research*, říjen 1982, roč. 42, č. 8, s. 3106-3110, ISSN 0008-5472.
- 71 SPANSWICK, Victoria J. et al. Evidence for different mechanisms of „unhooking“ for melphalan and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links *in vitro* and in clinical acquired resistant tumour samples. *BMC Cancer*, září 2012, roč. 12, č. 436, ISSN 1471-2407.
- 72 PIAGGI, Simona et al. Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity. *Carcinogenesis*, 2010, roč. 31, č. 5, s. 804-811, ISSN 0143-3334.
- 73 ENOIU, Milica – JIŘIČNÝ, Josef – SCHÄRER, Orlando D. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Research*, říjen 2012, roč. 40, č. 18, s. 8953-64, ISSN 0305-1048.
- 74 De SILVA, Inusha U. et al. Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin. *Nucleic Acid Research*, září 2002, roč. 30, č. 17, s. 3848-3856, ISSN 0305-1048.
- 75 ZHANG, Peilin et al. Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect *in vitro*. *Molecular Cancer*, leden 2003, roč. 2, č. 1, ISSN 1476-4598.

-
- 76 JIN,H-O et al. Silencing of Twist1 sensitizes NSCLC cells to cisplatin via AMPK-activated mTOR inhibition. *Cel Death and Disease*, květen 2012, roč. 3, č. e319, ISSN 2041-4889.
- 77 AHMED, Mushtaq – JAMIL, Kaiser. Cytotoxicity of neoplastic drugs Gefitinib, Cisplatin, 5-FU, Gemcitabine and Vinorelbine on human cervical cancer cells (HeLa). *Biology and Medicine*, 2011, roč. 3, č. 5, s. 60-71, eISSN 09748369
- 78 ROCCA, Céline J. et al. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: Implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *BiochemicalPharmacology*, říjen 2010, roč.80, č. 3, s. 335-343, ISSN 0006-2952.
- 79 De SILVA, Inusha U. et al. Defining the Roles of Nucleotide Excision Repair and Recombination in the Repair of DNA Interstrand Cross-Links in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, listopad 2000, roč. 20, č. 21, s. 7980-7990, ISSN 0270-7306.